

**Einfluss von reaktiven Spezies auf die elektrische
Aktivität von Neuronen dorsaler
Hinterwurzelganglien**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom-Biochemiker Martin Schink

geboren am 01.04.1989 **in** Magdeburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan H. Heinemann, Institut für Biochemie und Biophysik,
Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Gutachter: Prof. em. Dr. Ingo Dahse, Institut für Biochemie und Biophysik,
Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Terlau, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, In-
stitut für Physiologie, Kiel

Abgabe der Dissertation: 24. März 2016

Datum der Verteidigung: 18. Juli 2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Das periphere Nervensystem	1
1.1.1. Das somatosensorische Nervensystem	1
1.1.2. Afferente sensorische Nervenfasern und DRG-Neuronen . .	2
1.2. Aktionspotenziale	4
1.2.1. Repetitive Aktionspotenziale	4
1.2.2. Das einzelne Aktionspotenzial	5
1.2.3. Aktionspotenziale in DRG-Neuronen	6
1.3. Ionenkanäle	7
1.3.1. Ionenkanäle in DRG-Neuronen	7
1.3.2. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle	8
1.4. Der spannungsgesteuerte Natriumkanal Na _v 1.8	11
1.4.1. Eigenschaften	12
1.4.2. Aktionspotenziale in DRG-Neuronen und Na _v 1.8	12
1.4.3. Neuromodulation von Na _v 1.8	12
1.4.4. Pathophysiologie von Na _v 1.8	13
1.5. Reaktive Spezies	14
1.5.1. Reaktive Spezies und Neuropathien	15
1.5.2. Reaktive Spezies und Natriumkanäle	16
1.6. Ziele der Arbeit	16
2. Methoden	19
2.1. Chemikalien	19
2.2. Sequenzalignierung	19
2.3. Präparation von DRG-Neuronen	20
2.4. Heterologe Expression von Natriumkanalchimären	21
2.4.1. Eingesetzte Natriumkanalchimären	21
2.4.2. Zellkultur und Elektroporation	22
2.5. Die <i>patch clamp</i> -Methode	23
2.5.1. Prinzip und Messaufbau	24
2.5.2. Ganzzell-Stromklemme	25
2.5.3. Ganzzell-Spannungsklemme	27

2.6.	Erzeugung reaktiver Spezies	30
2.6.1.	Oxidanzien	30
2.6.2.	Bestrahlung mit blauem Licht	32
2.6.3.	<i>Lucifer yellow</i>	34
2.6.4.	Antioxidanzien	34
2.6.5.	DTNB	35
2.7.	Datenanalyse	35
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Reaktive Spezies vermindern die Frequenz repetitiver Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen	37
3.2.	Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen	39
3.2.1.	Überblick über Aktionspotenziale von Wildtyp- und Na _v 1.8 ^{-/-} -DRG-Neuronen der Maus	39
3.2.2.	Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale in Wildtyp-Neuronen stärker als in Na _v 1.8 ^{-/-} -Neuronen	41
3.2.3.	Die Wirkung von H ₂ O ₂ auf stimulierte Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen	44
3.2.4.	Reaktive Spezies ändern stimulierte Aktionspotenziale auch in Gegenwart von Tetrodotoxin	45
3.2.5.	Aktionspotenziale von MSRA ^{-/-} -Neuronen werden durch reaktive Spezies anders als Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen geändert	46
3.2.6.	Ascorbinsäure reduziert die Wirkung blauen Lichts auf Aktionspotenziale und ändert die Wirkung von Chloramin-T	47
3.3.	Reaktive Spezies vermindern Maximalstrom und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle von DRG-Neuronen	50
3.3.1.	Die Wirkung von Chloramin-T auf Na _v 1.8- und TTX-s-Ströme	50
3.3.2.	Die Wirkung von blauem Licht auf Na _v 1.8- und TTX-s-Ströme	52
3.3.3.	Änderungen der Strom-Spannungsbeziehungen von Na _v 1.8- und TTX-s-Kanälen durch reaktive Spezies	53
3.3.4.	Vergleich der Gleichgewichtsinaktivierung von Na _v 1.8- und TTX-s-Kanälen	54

3.3.5.	Kinetik der Wirkung von Blaulicht und Chloramin-T auf Maximalstrom und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle	56
3.3.6.	Dithiothreitol schützt die Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle	58
3.3.7.	Der spezifische Cystein-Modifikator DTNB verändert die Wirkung von ChT auf $\text{Na}_V1.8$ -Ströme nicht	60
3.4.	Chimäre Kanäle von $\text{rNa}_V1.8$ und $\text{rNa}_V1.4$ geben Aufschluss über Angriffsorte reaktiver Spezies	61
3.4.1.	Chloramin-T reduziert den Maximalstrom von $\text{rNa}_V1.8$ aber nicht den Maximalstrom von $\text{rNa}_V1.4$	62
3.4.2.	Kanalchimären weisen auf Besonderheiten der Domänen I und II von $\text{rNa}_V1.8$ hin	63
3.4.3.	IFC-Chimären zeigen die Wirkung von Chloramin-T bei besonders oxidationsempfindlicher Inaktivierung	66
3.4.4.	Chloramin-T reduziert den Maximalstrom auch bei geringerer Oxidationsempfindlichkeit der Inaktivierung	71
3.4.5.	Analyse der Strom-Spannungsbeziehungen der Chimären .	72
4.	Diskussion	75
4.1.	Aktionspotenziale in DRG-Neuronen werden durch reaktive Spezies beeinflusst	75
4.2.	$\text{Na}_V1.8$ ist besonders empfindlich gegenüber oxidativen Änderungen	77
4.3.	Reaktive Spezies beeinflussen Ströme spannungsgesteuerter Natriumkanäle auf vielfältige und komplexe Weise	77
4.4.	Der Zusammenhang zwischen der Änderung von Natriumkanalströmen und der Änderung von Aktionspotenzialen	80
4.5.	Hinweise auf molekulare Ursachen der Änderung von $\text{Na}_V1.8$ -Strömen	83
4.6.	Physiologische Relevanz der beobachteten Wirkung reaktiver Spezies	85
4.7.	Der potenzielle Einfluss anderer Ionenkanalfamilien	87
4.8.	Schlussfolgerung	88
5.	Zusammenfassung	90
5.1.	Deutschsprachige Zusammenfassung	90
5.2.	Summary (englischsprachige Zusammenfassung)	92
6.	Literaturverzeichnis	94

A. Primer-Sequenzen	VII
Danksagung	VIII
Selbstständigkeitserklärung	IX
Lebenslauf und Publikationsliste	X

Abkürzungsverzeichnis

Asc	– Ascorbinsäure
ChT	– Chloramin-T
CSS	– <i>complete saline solution</i>
D	– Domäne
DMEM	– <i>Dulbecco's modified Eagle's-Medium</i>
DNA	– Desoxyribonukleinsäure
DRG	– <i>dorsal root ganglion</i> , dorsales Hinterwurzelganglion
DTNB	– Dithionitrobenzoesäure
DTT	– Dithiothreitol
EGTA	– Ethylenglycol-bis(Aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -Tetraessigsäure
FKS	– fötales Kälberserum
HEPES	– 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
IFC	– Natriumkanal-Inaktivierungsmotiv mit Aminosäureaustausch (Isoleucin-Phenylalanin-Cystein)
IFL	– Natriumkanal-Inaktivierungsmotiv mit Aminosäureaustausch (Isoleucin-Phenylalanin-Leucin)
IFM	– natürliches Natriumkanal-Inaktivierungsmotiv (Isoleucin-Phenylalanin-Methionin)
I_{peak}	– Maximalstrom der Stromantwort
$I(V)$	– Strom-Spannungsbeziehung
k_m, k_h	– Spannungsabhängigkeit der Aktivierung bzw. Inaktivierung
LY	– <i>Lucifer yellow</i>
MSRA	– Methion-Sulfoxidreduktase A
NA	– numerische Apertur
Na_v	– spannungsgesteuerter Natriumkanal
ND7/23	– Hybrid-Zelllinie aus Maus-Neuroblastom N18Tg2 und DRG-Neuronen der Ratte
p	– statistisches Signifikanzniveau
PNS	– peripheres Nervensystem
R_i	– Inaktivierungsindex
RPMI	– <i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RS	– <i>reactive species</i> , reaktive Spezies
rpm	– Umdrehungen pro Minute
S	– Transmembransegment
Scn	– <i>sodium channel, voltage-gated</i> , Na_v -Kanalgenfamilie

tBHP	– <i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TRP	– <i>transient receptor potential</i> -Kanäle
TTX	– Tetrodotoxin
TTX-r	– Tetrodotoxin-resistent
TTX-s	– Tetrodotoxin-sensitiv
V_h	– Spannung halbmaximaler Inaktivierung
V_{inact}	– angelegte Spannung über 500 ms zur Ermittlung der Gleichgewichtsinaktivierung
V_m	– Spannung halbmaximaler Aktivierung
V_{RP}	– Ruhepotenzial
ZNS	– zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Das Nervensystem in Säugetieren dient der Informationsweiterleitung und -verarbeitung, um äußere und körpereigene Einflüsse wahrzunehmen und sämtliche Reaktionen eines Organismus zu veranlassen und zu steuern.

1.1. Das periphere Nervensystem

In Säugetieren umfasst das periphere Nervensystem (PNS) nach klassischer Definition alle Teile des Nervensystems außer dem Gehirn und dem Wirbelkanal, welche dem zentralen Nervensystem (ZNS) zugerechnet werden. Das periphere Nervensystem ist somit anatomisch abgegrenzt vom zentralen Nervensystem (Abb. 1.1) und verfügt über einen autonomen und einen somatischen Bereich (Kahle & Frotscher, 2012). Der autonome Bereich des PNS ist für Funktionen zuständig, die unbewusst ausgeführt werden, wie zum Beispiel den Herzschlag und kann funktionell weiter abgegrenzt werden: Das sympathische System kontrolliert die physiologische Reaktion auf Stresssituationen, während das parasympathische System in Ruhesituationen für ein metabolisches Gleichgewicht und die Erholung von Stresssituationen sorgt (Pape *et al.*, 2014). Das dritte System des autonomen PNS ist das enterische System, welches die Bewegung innerer Organe kontrolliert (Bear *et al.*, 2012).

Das somatische PNS verfügt über einen motorischen und einen sensorischen Bereich. Der motorische Bereich des somatischen PNS ist zuständig für die Ausführung von Befehlen des Gehirns und deshalb grundlegend für bewusste Muskelbewegungen. Der sensorische Bereich des somatischen PNS hingegen ist für die Weiterleitung von Signalen aus peripheren Organen an das zentrale Nervensystem verantwortlich und daher zuständig für unwillkürliche motorische Bewegungen (zum Beispiel bei Reflexen). Die Signalweiterleitung bildet weiterhin die Grundlage für somatosensorische Sinnesempfindungen (Kandel *et al.*, 2012).

1.1.1. Das somatosensorische Nervensystem

Die Hauptaufgabe des somatosensorischen Nervensystems umfasst allgemein die Sinneswahrnehmung von Körperposition, Druck, Temperatur und Schmerz in peripheren Körperstrukturen und Organen wie der Haut, Muskeln oder Gelenken. Infolgedessen ermöglicht dieser Teil des PNS unter anderem den Gleichgewichtssinn und das Tastempfinden. Jeder somatosensorische Sinnesindruck kann in weitere, spezialisierte Sinnesindrücke unterteilt werden, die gemeinsam zu einer detaillierten Wahrnehmung ver-

helfen. Auf diese Weise kann bei Berührung einer Oberfläche mit der Haut neben der Temperatur auch die Form und Textur des Objektes ermittelt werden.

Bei starker Reizung setzt unabhängig von der Art des Reizes die Wahrnehmung von Schmerz ein, welcher ein rechtzeitiges und überlebenswichtiges Alarmsignal für potenzielle Gefahren für die Integrität des Organismus darstellt (Lee & Spanswick, 2006). Eintreffende Informationen werden entweder noch innerhalb der Wirbelsäule verarbeitet und führen zur Auslösung von Reflexen oder sie werden vom Thalamus im Gehirn geprüft und bewertet, um anschließend eine komplexere Reaktion auszulösen. Die präzise örtliche und zeitliche Auflösung eines Reizes wird durch unterschiedlich große und sensitive Rezeptorfelder erreicht. Dies sind bestimmte sensorische Bereiche der Peripherie, die sich in ihrer Morphologie und der Ausprägung sensorischer Proteine unterscheiden, um diversen Empfindungsmodalitäten gerecht zu werden (Pape *et al.*, 2014). Die Rezeptoren werden von afferenten sensorischen Nerven innerviert.

1.1.2. Afferente sensorische Nervenfasern und DRG-Neuronen

Afferente sensorische Nervenfasern lassen sich nach ihrem Durchmesser und der Signalweiterleitungsgeschwindigkeit in vier Klassen unterteilen: A α -, A β -, A δ - und C-Nervenfasern (Kandel *et al.*, 2012). A α - und A β -Fasern sind durch Oligodendrozyten stark myelinisiert. Dies bewirkt eine starke elektrische Isolierung der Nervenfasern und ermöglicht dadurch saltatorische Erregungsleitung. Daher sind A α - und A β -Fasern schnell leitend und hauptsächlich zuständig für die Weiterleitung von vielfältigen mechanischen Reizen sowie die Erfassung von Muskelbewegung. Dies ist notwendig, da Signalverzögerungen in diesem körpereigenen Lagesystem zu mechanischen Instabilitäten im gesamten Organismus führen würden. Die schwach myelinisierten A δ - und unmyelinisierten C-Fasern sind kontinuierlich und folglich langsam leitend. Ihre freien Nervenendigungen sind morphologisch weit weniger komplex als die der A α - und A β -Fasern, dafür enthalten sie vielfältige sensorische Proteine, um Temperatur- und Schmerzreize zu transduzieren. Auf dem Weg zu spezialisierten Empfangssystemen wie efferenten Neuronen, Interneuronen und dem Thalamus im Gehirn passieren Signale afferenter sensorischer Nervenfasern auch die Neurone dorsaler Hinterwurzelganglien.

Als dorsale Hinterwurzelganglien (englisch *dorsal root ganglia*, DRG) bezeichnet man an den Wirbelkanal angeschlossene Knotenpunkte des afferenten sensorischen Nervensystems. Sie sind zwischen nebeneinanderliegenden Wirbeln in Aussparungen am Übergang zwischen äußerer und innerer Wirbelsäule situiert und enthalten hunderte bis tausende Zellkörper der afferenten Nervenfasern, sogenannte DRG-Neuronen. Diese DRG-Neuronen sind integrale Schaltstellen am Übergang des peripheren in das zentrale Ner-

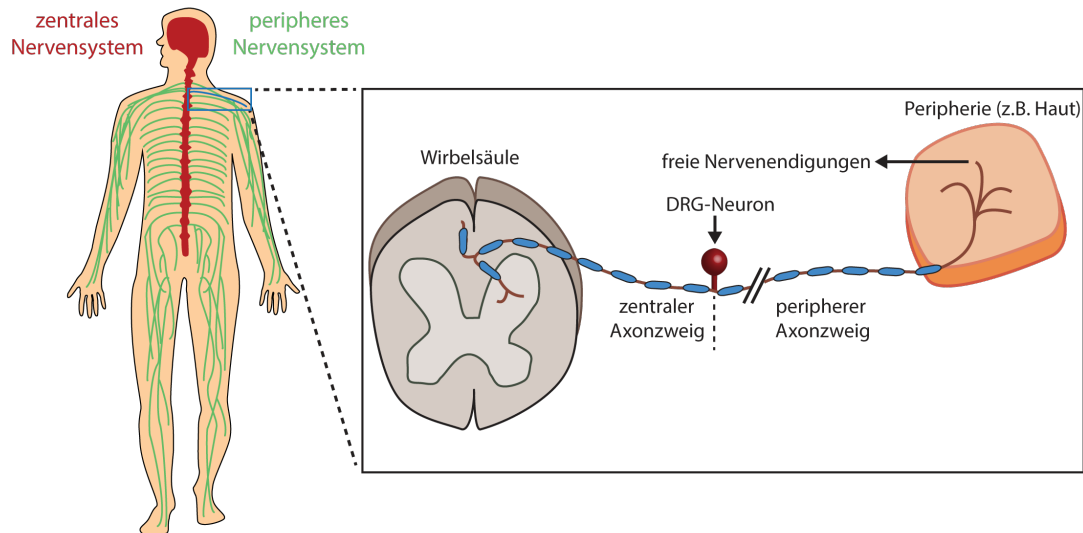


Abbildung 1.1.: Das periphere Nervensystem und DRG-Neuronen. Überblick über das zentrale (rot) und periphere (grün) Nervensystem im Menschen (links). Vergrößerte, beispielhafte Darstellung eines peripheren sensorischen Nerves mit Verzweigung in der Haut (blau), dem zugehörigen Zellkörper (DRG-Neuron) und Nervenendigungen im Wirbelkanal (rechts).

vensystem und essentiell für die elektrische Signalweiterleitung (Pape *et al.*, 2014). Während der Embryogenese entwickeln sich die DRG-Neuronen anfänglich bipolar aus der Neuralleiste (Marani & Lakke, 2012). Von ihnen geht die Bildung der afferenten Nervenfasern in genau definierte periphere Körperbereiche aus. Nach dem die Nervenfasern ausgebildet sind, werden sie unter anderem von den DRG-Neuronen metabolisch versorgt. DRG-Neuronen beziehungsweise die aus ihnen hervorgehenden sensorischen Nervenfasern, besitzen nach abgeschlossener Entwicklung eine einzigartige Pseudo-Unipolarität mit nur einem gegabelten Axon. Dieses teilt sich in einen peripheren und einen zentralen Zweig auf. Der periphere Zweig dieses Axons endet in den peripheren Organen und nimmt dort über Verzweigungen Signale unterschiedlicher Art auf, die in elektrische Signale transduziert und in Richtung Wirbelsäule weitergeleitet werden. Der zentrale Zweig des Axons tritt am dorsalen Horn in die Wirbelsäule ein und teilt sich weiter auf in lokale Nervenendigungen, die in die graue Substanz des Wirbelkanals führen, sowie aufsteigende Nervenendigungen, die in der Verbindung des Wirbelkanals mit der Medulla enden. Die lokalen Endigungen sind vor allem relevant für die Auslösung von Reflexen, während die aufsteigenden Endigungen die Basis für die Informationsweiterleitung in das Gehirn bilden (Bear *et al.*, 2012).

1.2. Aktionspotenziale

Die Grundlage der Signalweiterleitung im Nervensystem sind elektrische Signale, sogenannte neuronale Aktionspotenziale. Diese sind definiert als transiente, depolarisierende Abweichungen vom Ruhepotenzial (Kandel *et al.*, 2012). Aktionspotenziale können an unterschiedlichen Positionen in Neuronen im Allgemeinen durch depolarisierende Ströme entstehen. Wird die Membranspannung dadurch positiver als ein bestimmter Schwellenwert, werden direkt Aktionspotenziale ausgelöst. Alternativ können mehrere depolarisierende Ströme zu Potenzialen mit geringer Amplitude führen, sogenannten *graded potentials*. Diese können summiert werden, wodurch es schließlich am *axon initial segment*, einem peripheren Axonbereich mit besonders vielen spannungsgesteuerten Ionenkanälen, zur Auslösung eines oder mehrerer Aktionspotenziale kommt (Colbert & Johnston, 1996). Die entstandenen Aktionspotenziale werden über die Membran des Axons weitergeleitet und sorgen schließlich am synaptischen Endknöpfchen, dem terminalen Zellmembranbereich des zentralen Axonzweigs, für transiente Depolarisationen. Durch sich infolgedessen öffnende Calciumkanäle kommt es zu einer Calciumfreisetzung im synaptischen Endknöpfchen, die wiederum zur vesikulären Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt führt. Durch diesen Prozess wird das Signal an das postsynaptische Neuron übertragen (Mulkey & Zucker, 1991).

1.2.1. Repetitive Aktionspotenziale

Die Kodierung von komplexen Informationen im Nervensystem erfolgt in Form von repetitiven Aktionspotenzialen. Die übertragene Information hängt dabei nicht von der Amplitude individueller Aktionspotenziale ab, sondern von der Frequenz, der Anzahl von Aktionspotenzialen in einer bestimmten Zeit (*rate coding*). Zusätzlich tragen höchstwahrscheinlich die Latenz vor Beginn einer Aktionspotenzialserie und die Zeitpunkte einzelner Aktionspotenziale innerhalb der Serie (*temporal coding*) ebenfalls qualitativ zur übertragenen Information bei (Stanley, 2013). Eine weitere Steigerung der Komplexität wird durch unterschiedliche Synchronität bei der Erzeugung und Weiterleitung der Aktionspotenziale erreicht, die im Gehirn aufgeschlüsselt werden kann (Brette, 2012). Unterschiedliche Neuronenarten zeichnen sich außerdem durch charakteristische Aktionspotenzialserien aus, die auf den jeweiligen spezifischen Zweck der weitergeleiteten Signale abgestimmt sind. Eine typische Aktionspotenzialserie in DRG-Neuronen ist in Abbildung 1.2 gezeigt.

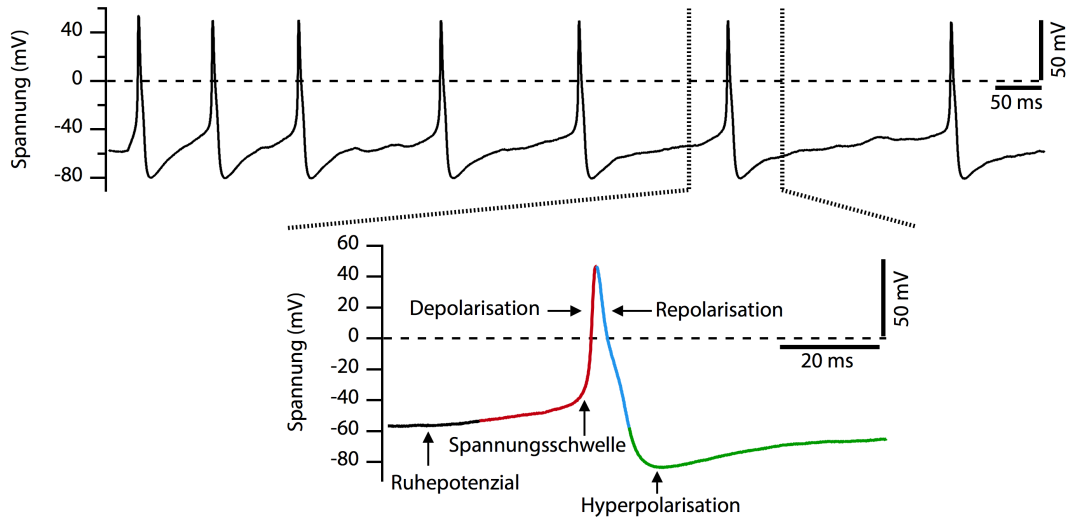


Abbildung 1.2.: Beispielhafte Aktionspotenziale in DRG-Neuronen der Maus. Oben: Aktionspotenzialserie ausgelöst durch eine Strominjektion von 25 pA. Unten: Vergrößerte Darstellung eines Aktionspotenzials der gezeigten Serie mit Markierung des Ruhepotenzials (schwarz), der Depolarisation (rot), der Repolarisation (blau) und der Hyperpolarisation (grün).

1.2.2. Das einzelne Aktionspotenzial

Im Ruhezustand liegt an der Zellmembran von Nervenzellen das Ruhepotenzial an. Dieses Potenzial ist maßgeblich durch die hohe Permeabilität der Membran gegenüber Kaliumionen bestimmt und demzufolge nahe dem Gleichgewichtspotenzial von Kaliumionen. Davon ausgehend durchläuft jedes einzelne Aktionspotenzial einer Aktionspotenzialserie charakteristische Phasen: Wenn beispielsweise *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle in den Nervenendigungen öffnen oder ein weitergeleitetes Aktionspotenzial an der Membran eintrifft, wird die Membran depolarisiert. Infolgedessen öffnen zunehmend spannungsgesteuerte Natriumkanäle, die durch einen beginnenden Einstrom positiv geladener Natriumionen eine weitere Depolarisation der Membran antreiben. Ist die Membranspannung positiv genug, dass eine von Neuron zu Neuron unterschiedliche Alles-oder-Nichts-Schwelle von etwa -50 mV bis -30 mV erreicht ist, kommt es unweigerlich zu einer umfassenden, progressiven Öffnung zusätzlicher Natriumkanäle und folglich zu einem immer positiveren Membranpotenzial bis knapp unterhalb des Gleichgewichtspotenzials von Natriumionen von ungefähr $+40$ mV bis $+60$ mV. Diese Phase wird auch als schneller Aktionspotenzialaufstrich bezeichnet. Nach dem Öffnen spannungsgesteuerter Natriumkanäle werden diese über einen intrinsischen Mechanismus wieder

verschlossen beziehungsweise inaktiviert. Zusätzlich öffnen sich verschiedene Typen von Calciumkanälen, die einen Einstrom von Calciumionen in die Zelle vermitteln, welcher schließlich zur erwähnten Vesikelfreisetzung am synaptischen Endknöpfchen führt. Des Weiteren tragen Calciumkanäle zur Fallphase des Aktionspotenzials und somit zur sogenannten Repolarisation der Membran bei (Catterall *et al.*, 2005b). Den größten Anteil an der Repolarisation der Membran haben Calcium-aktivierte und spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, durch die positiv geladene Kaliumionen aus der Zelle ausströmen. Meist sorgt der Kaliumauswärtsstrom außerdem dafür, dass die Zelle hyperpolarisiert wird, teils bis auf -95 mV. Nach einer kurzen Refraktärzeit, in der kein Aktionspotenzial gefeuert werden kann, nähert sich die Zelle schlussendlich wieder ihrem Ruhepotenzial an, bevor sie in der Lage ist, ein weiteres Aktionspotenzial zu generieren.

Die Alles-oder-Nichts-Schwelle sorgt dabei sowohl für das Aussortieren von Signalen geringer Intensität, als auch für das verlässliche Feuern jedes einzelnen Aktionspotenzials. Durch die Inaktivierung der Natriumkanäle und das Öffnen der Kaliumkanäle während jeder Fallphase wird die Richtung der Signalweiterleitung sichergestellt, sodass Aktionspotenziale nicht rückläufig sein können.

1.2.3. Aktionspotenziale in DRG-Neuronen

Aufgrund des langen Axons und der wirbelsäulennahen Lage des Zellkörpers von DRG-Neuronen tragen vor allem die meist stark verzweigten freien Nervenendigungen in der Peripherie zur Entstehung von Aktionspotenzialen in DRG-Neuronen bei. Diese morphologisch vielfältigen Endigungen sind mit einem umfangreichen Arsenal von ionotropen Rezeptoren ausgestattet, die in der Lage sind, lokale Depolarisationen hervorzurufen.

DRG-Neuronen haben im Ruhezustand ein Ruhepotenzial zwischen -45 und -75 mV (Amir *et al.*, 1999; Blair & Bean, 2002). Unter anderem aufgrund des Vorkommens verschiedener Ionenkanalfamilien unterscheiden sich Aktionspotenziale in den einzelnen Klassen von DRG-Neuronen beträchtlich (Lüscher *et al.*, 1994b). Aktionspotenziale in A α -, A β - und A δ -Nervenfasern werden bei vergleichsweise negativen Schwellenspannungen von weniger als -35 mV ausgelöst (Matsutomi *et al.*, 2006). Aktionspotenziale dieser Nervenfasern weisen weiterhin eine kurze Aktionspotenzialdauer sowie einen steilen Anstieg des Aktionspotenzialaufstrichs von ungefähr 200 V s^{-1} bis 300 V s^{-1} auf (Villière & McLachlan, 1996). C-Fasern, deren Zellkörper in der vorliegenden Arbeit primär untersucht wurden, zeigen dagegen breitere Aktionspotenziale, werden bei einer positiveren Spannungsschwelle ausgelöst und haben einen weniger steilen Aufstrich von ungefähr 170 V s^{-1} (Chahine *et al.*, 2005; Villière & McLachlan, 1996).

1.3. Ionenkanäle

Ionenkanäle sind membranständige Proteine, durch die bestimmte Sorten von Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten fließen. Aus diesem Grund ermöglichen Ionenkanäle elektrisch erregbaren Zellen unter anderem eine gezielte temporäre Abweichung vom Ruhepotenzial, um Signale weiterzuleiten und intrazelluläre Reaktionen hervorzurufen. Ubiquitär sorgen sie auch für den Ausgleich des Säure-Base-Haushalts und für den Erhalt osmotischer Homöostase (Hille, 2001). Somit sind Ionenkanäle an der Kommunikation von Zellen sowie der Reaktion auf innere und äußere Einflüsse maßgeblich beteiligt. In Säugetieren ist eine Vielzahl unterschiedlicher Ionenkanäle für Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chloridionen vorhanden. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Struktur und Selektivität. Ionenkanäle können unterschiedlich aktiviert werden. Ligandengesteuerte Ionenkanäle werden zum Beispiel durch die Bindung bestimmter Moleküle geöffnet, während mechanosensitive Ionenkanäle durch Druck oder Zug gesteuert werden (Aidley & Stanfield, 1996). Unerlässlich für alle erregbaren Zellen sind spannungsgesteuerte Ionenkanäle, deren Schaltverhalten an Spannungsänderungen über der Zellmembran gekoppelt ist.

1.3.1. Ionenkanäle in DRG-Neuronen

Die vielfältige Reizaufnahme von DRG-Neuronen wird auf molekularer Ebene unter anderem durch viele unterschiedliche Ionenkanalfamilien ermöglicht. Dazu gehören allein 17 verschiedene Vertreter der TRP-Ionenkanalfamilie. Diese Kanäle sind hauptsächlich für die polymodale Sensitivität von DRG-Neuronen für Hitze, Kälte und verschiedenen Chemikalien wie Menthol verantwortlich (Vandewauw *et al.*, 2013). Des Weiteren gibt es spezialisierte Ionenkanäle für die Erkennung von niedrigen pH-Werten, sogenannte ASICs (englisch *acid sensing ion channels*, Waldmann *et al.*, 1997) und mechanosensitive Kanäle wie Piezo1 und Piezo2, die ausschließlich durch mechanische Reize aktiviert werden (Coste *et al.*, 2010).

Für die elektrische Signalweiterleitung sind hingegen in DRG-Neuronen verschiedene Vertreter spannungsgesteuerter Ionenkanäle mit Selektivität für Natrium-, Calcium- oder Kaliumionen verantwortlich.

Ionenkanäle können über die unterschiedliche Sensitivität gegenüber Toxinen und endogenen Botenstoffen moduliert werden, um Signale zu beeinflussen. Ein weiterer Aspekt der Modulation ist die Expressionsebene: In Abhängigkeit von Verletzungen oder Entzündungen werden Vertreter der einzelnen Ionenkanalfamilien entweder herunter- oder heraufreguliert, um Reizschwellen anzupassen (Waxman & Zamponi, 2014).

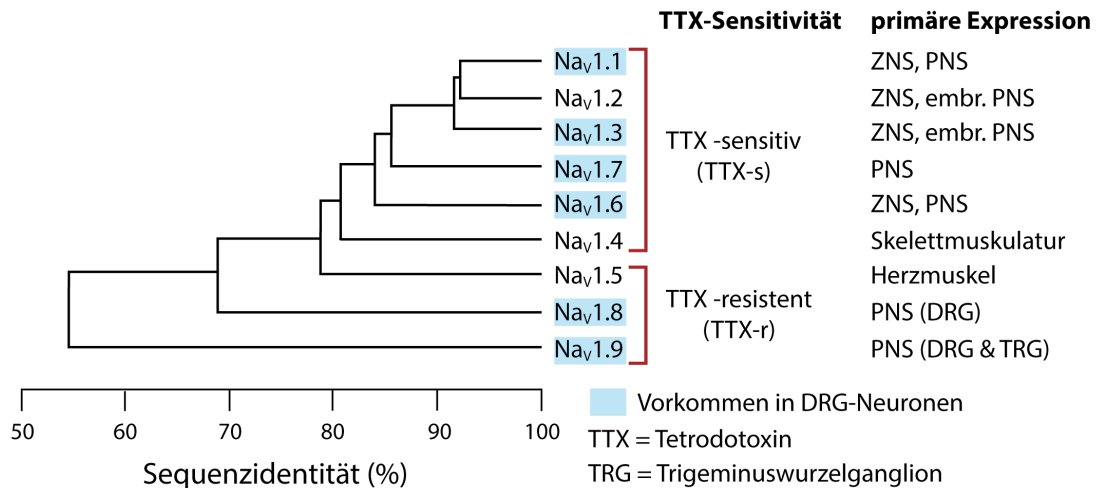


Abbildung 1.3.: Die Familie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle. Die neun α -Subtypen spannungsgesteuerter Natriumkanäle in Säugetieren am Beispiel der Mausvarianten im Vergleich hinsichtlich der prozentualen Aminosäuresequenzidentität, Sensitivität gegenüber Tetrodotoxin (TTX), Gewebe der häufigsten natürlichen Expression und Vorkommen in DRG-Neuronen. Für die Sequenzalignierung wurden die vollständigen Aminosäuresequenzen der Natriumkanäle genutzt (siehe Abschnitt 2.2).

1.3.2. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

In Säugetieren sind bislang neun verschiedene Mitglieder der Familie der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Na_v) bekannt (siehe Abbildung 1.3), die hauptsächlich im Nervensystem und der Skelett- und Herzmuskulatur vorkommen (De Lera Ruiz & Kraus, 2015). Die spannungsgesteuerten Natriumkanäle weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf (Patlak, 1991).

Infolge von Membrandepolarisationen werden diese Kanäle schnell aktiviert. Da unter physiologischen Bedingungen im extrazellulären Milieu die Konzentration von Natriumionen deutlich größer ist als im Inneren der Zelle, ermöglichen sie somit den Einstrom von Natriumionen in die Zelle, was zu einer zusätzlichen Depolarisation der Zellmembran führt. Das macht spannungsgesteuerte Natriumkanäle zur Voraussetzung für die Erzeugung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen in erregbaren Zellen. Aus diesem Grund finden sie sich in besonderer Häufung (ca. 200 pro μm^2) am *axon initial segment*, dem Bereich des Neurons, an dem die Aktionspotenziale ausgelöst werden (Kole *et al.*, 2008). Die höchste Dichte an spannungsgesteuerten Natriumkanälen findet man jedoch an Ranvier'schen Schnürringen (bis zu 2000 pro μm^2), wo sie für die Regeneration eintreffender Aktionspotenziale und demzufolge für die schnelle elektrische Signalweiterleitung sorgen (Safronov *et al.*, 1999).

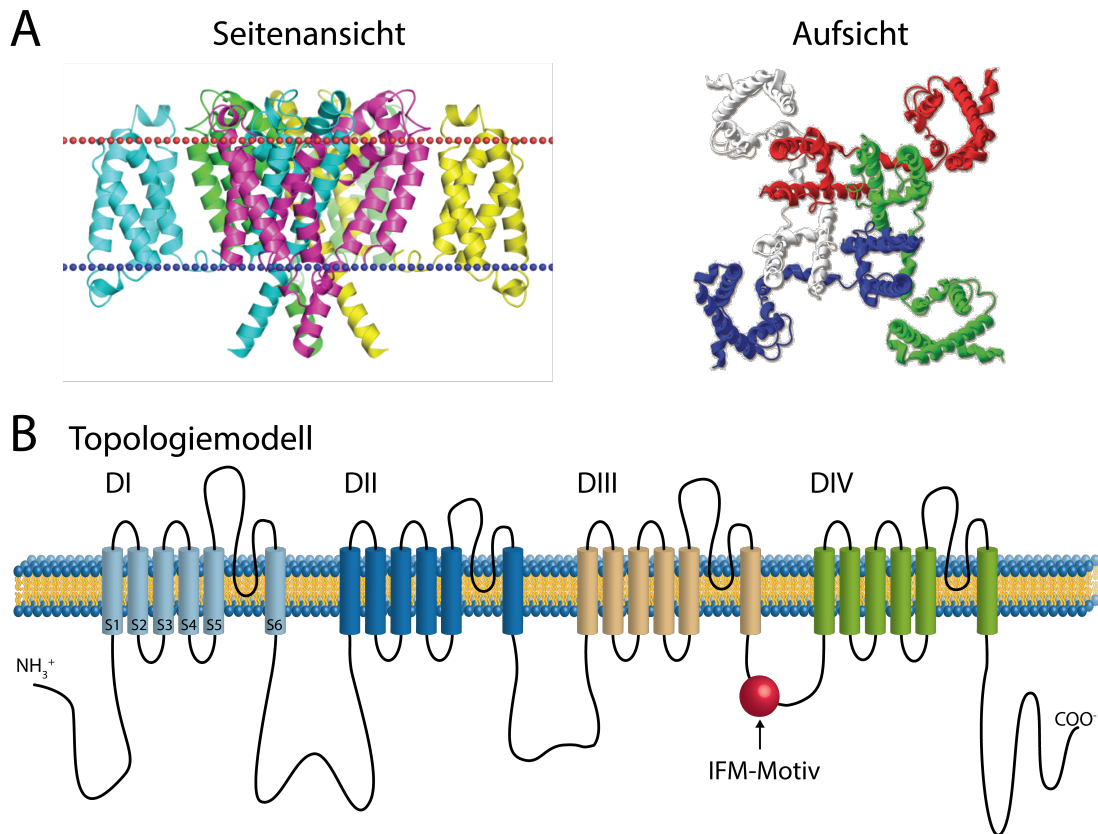


Abbildung 1.4.: Struktur- und Topologiemodell spannungsgesteuerter Natriumkanäle.

A Seitenansicht des bakteriellen spannungsgesteuerten Natriumkanals NavCt (Tsai *et al.*, 2013) und Aufsicht auf den bakteriellen Natriumkanal NavAb (Payandeh *et al.*, 2011), jeweils mit vier unterschiedlich eingefärbten Untereinheiten, die homolog zu den Domänen eukaryotischer spannungsgesteuerter Natriumkanäle sind. **B** Topologiemodell eines eukaryotischen spannungsgesteuerten Natriumkanals. Transmembransegmente derselben Farbe gehören zu einer Domäne (DI – DIV). Die Domänen sind über große intrazelluläre *linker* miteinander verbunden. Das Spannungssensorsegment S4 jeder Domäne ist verantwortlich für die spannungsabhängige Öffnung des Kanals. Die Kanalpore wird durch die Segmente S5 und S6 gebildet. Rot eingezeichnet ist das Inaktivierungsmotiv IFM.

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle werden vor allem entsprechend ihrer Sensitivität gegenüber dem unter anderem im Kugelfisch (*Tetraodontidae*) vorkommenden Gift Tetrodotoxin (TTX), in TTX-sensitiv (TTX-s) und TTX-resistent (TTX-r) unterteilt (siehe Abb. 1.3). Die halbmaximale Inhibierung der TTX-resistenten Kanäle $\text{Na}_v 1.5$, $\text{Na}_v 1.8$ und $\text{Na}_v 1.9$ erfolgt in mikromolaren Konzentrationen, während die anderen sechs spannungsgesteuerten Natriumkanäle bereits von nanomolaren Konzentrationen inhibiert werden (Catterall *et al.*, 2005a).

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind große Proteine (>200 kD), die sich aus einer α -Untereinheit und assoziierten funktionellen β -Untereinheiten zusammensetzen. Die ungefähr 2000 Aminosäuren große α -Untereinheit besteht aus vier miteinander verbundenen und in der Tertiärstruktur kreisförmig angeordneten Domänen mit jeweils sechs Transmembranhelices beziehungsweise Transmembransegmenten (De Lera Ruiz & Kraus, 2015). Aufgrund ihrer Größe und Flexibilität konnten bisher noch keine vollständigen Strukturen von Säugetier-Natriumkanälen aufgeklärt werden. Es konnten jedoch viele strukturelle Informationen aus der Kristallstruktur des bedeutend kleineren bakteriellen Natriumkanals NavAb abgeleitet werden (Payandeh *et al.*, 2011).

Die Segmente S1–S3 unterstützen beziehungsweise schützen das als Spannungssensor bezeichnete Segment S4 bei der Reaktion auf Spannungsänderungen, weshalb die Segmente S1–S4 zusammen auch als Spannungssensor-Domäne bezeichnet werden (Ahern *et al.*, 2016). Das Segment S4 enthält überdurchschnittlich viele positive Aminosäurereste. Liegt an der Zellmembran das Ruhepotenzial an, befinden sich spannungsgesteuerte Natriumkanäle im geschlossenen, aktivierbaren Zustand. Wird die Zellmembran nun depolarisiert und die Membranspannung positiver, bewegen sich die positiv-geladenen S4-Helices in Richtung der extrazellulären Seite aus der Membran heraus, was zu Konformationsänderungen in den jeweiligen Domänen und schließlich innerhalb von Mikrosekunden zur Öffnung der Kanalpore führt (Zhang *et al.*, 2011). Diese wird von den Segmenten S5 und S6 gebildet, deren Linker, die sogenannte Porenschleife, in die Pore hereinragt (Lukacs *et al.*, 2014). Über die Spannungssensoren, vor allem aus Domäne 4, ist die sogenannte Inaktivierung intrinsisch an diesen Aktivierungsprozess gekoppelt (Ahern, 2013; Cha *et al.*, 1999). Nach dem Öffnen des Kanals verschließt das Tripeptid-Motiv Isoleucin-Phenylalanin-Methionin (IFM), das im Linker zwischen Domäne III und IV situiert ist, die Pore umgehend wieder von der Innenseite und stoppt dadurch den Ioneneinstrom wie in Abbildung 1.5 beispielhaft dargestellt (West *et al.*, 1992). Erst bei Repolarisation der Zellmembran können spannungsgesteuerte Natriumkanäle aus diesem Zustand der Inaktivierung wieder in den aktivierbaren Grundzustand zurückkehren.

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind hochselektiv für Natriumionen. Diese Selektivität wird innerhalb der Kanalpore über einen Selektivitätsfilter genannten Bereich verursacht. Dieser Selektivitätsfilter besteht aus den vier Aminosäuren, Aspartat, Glutamat, Lysin und Alanin, kurz DEKA (Heinemann *et al.*, 1992). Durch dieses Selektivitätsmotiv ist es etwa 10 bis 30 mal wahrscheinlicher, dass Natrium- statt Kaliumionen durch die Natriumkanalpore treten (Schlief *et al.*, 1996).

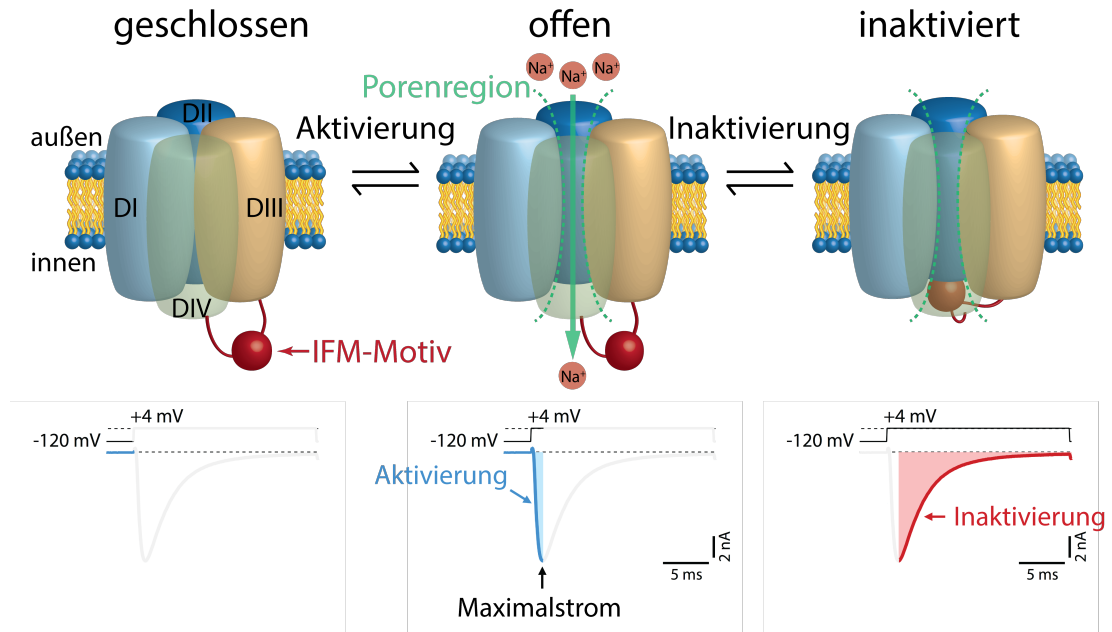


Abbildung 1.5.: Vereinfachtes Schaltverhalten eines spannungsgesteuerten Natriumkanals mit schneller „ball and chain“-Inaktivierung. Oben: Darstellung des jeweiligen Kanalzustands. Unten: Repräsentative $Na_V1.8$ -Stromspuren, passend eingefärbt zum jeweils veranschaulichten Zustand (nicht-zutreffende Bereiche der Stromantwort sind grau eingefärbt). Infolge von Membrandepolarisation wird ein spannungsgesteuerter Natriumkanal geöffnet und dann vom IFM-Inaktivierungsmotiv intrazellulär wieder verschlossen. Erst die Repolarisation der Membran überführt den Kanal vom inaktivierten Zustand wieder in den aktivierbaren Grundzustand.

1.4. Der spannungsgesteuerte Natriumkanal $Na_V1.8$

Ursprünglich ging man davon aus, dass der spannungsgesteuerte Natriumkanal $Na_V1.8$ ausschließlich in DRG-Neuronen vorkommt, weshalb er in früherer Literatur auch englisch *sensory neuron specific* (SNS) genannt wurde (Akopian *et al.*, 1999). Mittlerweile hat sich allerdings herausgestellt, dass dieser Kanal in Säugetieren auch in Kardiozyten vorkommt (Verkerk *et al.*, 2012), sowie in der Retina (O'Brien *et al.*, 2008) und sogar in Spermien (Cejudo-Roman *et al.*, 2013). Innerhalb sensorischer Nervenfasern befindet sich $Na_V1.8$ besonders an den Zellkörpern und freien Nervenendigungen (Persson *et al.*, 2013). Außerdem zeigte sich, dass $Na_V1.8$ zwar präferentiell in kleinen, C-Faser-assoziierten DRG-Neuronen gebildet wird, jedoch auch in bis zu 40 % der größeren, mechanosensitiven DRG-Neuronen vorkommt (Shields *et al.*, 2012).

1.4.1. Eigenschaften

Na_v1.8 wird den TTX-resistenten Natriumkanälen zugerechnet ($IC_{50} = 60 \mu\text{M}$) und besteht aus ungefähr 2000 Aminosäuren. Er wird typisch für spannungsgesteuerte Natriumkanäle schnell aktiviert Aktivierungszeitkonstante ($\tau_a = 0,54 \text{ ms}$ bei -20 mV , Catterall *et al.*, 2005a). Dabei liegt der Spannungsbereich der halbmaximalen Aktivierung in Maus-DRG-Neuronen bei ungefähr -45 mV bis -30 mV . Na_v1.8 inaktiviert allerdings deutlich langsamer als die meisten anderen spannungsgesteuerten Natriumkanäle, mit Ausnahme von Na_v1.9 (Inaktivierungszeitkonstante τ_h für Na_v1.8 $\approx 13,5 \text{ ms}$ bei -20 mV , ebd.). Wegen einer kanalspezifischen Tetrapeptid-Sequenz (SLEN) im S3-S4-Linker der Domäne III kehrt Na_v1.8 jedoch schnell aus der Inaktivierung zurück (Rückkehrzeitkonstante $\tau_{rec} \approx 3 \text{ ms}$ bei Repolarisation auf -120 mV , Dib-Hajj *et al.*, 1997).

1.4.2. Aktionspotenziale in DRG-Neuronen und Na_v1.8

Durch die halbmaximale Aktivierungsspannung von etwa -50 mV bis -30 mV wird der Kanal Na_v1.8 ungefähr im Bereich der Schwellenspannung eines Aktionspotenzials geöffnet, woraufhin dieser Kanal den Aufstrich des Aktionspotenzials antreibt und in DRG-Neuronen für bis zu 90 % des währenddessen fließenden Einwärtsstroms verantwortlich ist (Renganathan *et al.*, 2001). Die verhältnismäßig langsame Inaktivierung von Na_v1.8 prägt die Fallphase der in diesen Zellen ausgelösten Aktionspotenziale maßgeblich mit und kann sogar die Hyperpolarisation der Zelle verhindern (Blair & Bean, 2002). Außerdem trägt Na_v1.8 auch dazu bei, die Amplitude von repetitiven Aktionspotenzialen aufrecht zu erhalten und das schnelle Auslösen von Aktionspotenzialen in DRG-Neuronen überhaupt erst zu ermöglichen (Harty & Waxman, 2007; Rush *et al.*, 2007). Dafür ist die bereits erwähnte schnelle Rückkehr aus der Inaktivierung entscheidend. Na_v1.8 ist dementsprechend von fundamentaler Bedeutung für Aktionspotenziale in DRG-Neuronen.

1.4.3. Neuromodulation von Na_v1.8

Da spannungsgesteuerte Natriumkanäle eine essentielle Rolle in der Erregbarkeit von Neuronen spielen, sind sie auf mannigfaltige Art in ihrem Transport zur Plasmamembran und in ihrer Funktionalität reguliert (Chen-Izu *et al.*, 2015). So haben neurotrophische Faktoren wie NGF und GDNF, aber auch Zytokine wie TNF- α Einfluss auf die Expression des Na_v1.8-Kanalgens *Scn10A* (Cummins *et al.*, 2000; He *et al.*, 2010). Weiterhin kann Na_v1.8 durch Calcium beziehungsweise Calmodulin reguliert werden, um

über die Beeinflussung der Inaktivierung die Aktionspotenzialfrequenz zu reduzieren und folglich eine Überakkumulation von Calcium zu verhindern (Choi *et al.*, 2006). Posttranslationale Modifikationen sind häufig und wirken im Falle von Phosphorylierungen aktivierend auf den Na_v1.8-Gesamtstrom durch eine Verschiebung der Aktivierung und Inaktivierung (Scheuer, 2011). Assoziierte Natriumkanal- β -Untereinheiten, die entweder nicht-kovalent oder über Disulfidbrücken mit Na_v1.8 verbunden sind, vermögen Aktivierung, Inaktivierung und Kinetik unterschiedlich zu ändern. Dabei können diese auch selbst modifiziert werden (Brackenbury & Isom, 2011; Vijayaragavan *et al.*, 2001).

1.4.4. Pathophysiologie von Na_v1.8

Na_v1.8 ist mit vielen pathologischen Erscheinungen assoziiert, unter anderem dem Brugada-Syndrom, einer vererbten Krankheit des Herzens (Hu *et al.*, 2014). Die überwiegenden pathologischen Erscheinungen unter Beteiligung von Na_v1.8 sind allerdings Erkrankungen des peripheren Nervensystems, sogenannte Neuropathien. Na_v1.8 wurde unter anderem eine Rolle bei Morbus Charcot-Marie-Tooth zugewiesen (Moldovan *et al.*, 2011), wobei es zu fortschreitendem Verlust von Muskel- und Nervengewebe kommt. Die meisten Neuropathien führen allerdings zu Beeinträchtigungen der somatosensorischen Wahrnehmung (Zimmermann, 2001). Weitreichende Konsequenzen haben diese Art von Erkrankungen in Form von abnormaler Schmerzwahrnehmung, beispielsweise bei chronischen Schmerzen oder Phantomschmerzen. Die Ursachen sind unter anderem verletzungsbedingte Schäden sensorischer Nerven (Seltzer *et al.*, 1990) oder langjährige Diabetes-Erkrankungen (Bierhaus *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2004). Viele Neuropathien, die mit gestörter Schmerzwahrnehmung assoziiert sind, weisen eine pathologisch erhöhte Aktivität von Na_v1.8 auf (Nickel *et al.*, 2012). Klinisch nachgewiesen ist, dass in etwa 5 % aller Schmerz-assoziierten Neuropathien *gain of function*-Mutationen in Na_v1.8 vorliegen (Faber *et al.*, 2012). In Folge von Nervenschäden zeigt der Kanal nicht nur eine gesteigerte Aktivität, sondern ist auch auf Expressionsebene hochreguliert und in benachbarten Nervenfasern akkumuliert, die nicht verletzt sind (Bird *et al.*, 2013; Gold *et al.*, 2003; Woolf & Mannion, 1999), was daraufhin zu krankhafter Erregbarkeit führt. Vor allem durch die Entwicklung von *knock down*- und *knock out*-Mauslinien, bei denen der Kanal Na_v1.8 auf unterschiedliche Weise funktionell inaktiviert wurde, konnte seine elementare Rolle bei der Schmerzweiterleitung ermittelt werden (Akopian *et al.*, 1999). Sowohl neuropathische, als auch inflammatorische Schmerzen sind bei funktioneller Inaktivierung von Na_v1.8 deutlich attenuiert (Jarvis *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite konnte selbst durch die Zerstörung Na_v1.8-positiver DRG-Neuronen durch Diphtherie-Toxin kein signifikanter Einfluss auf die somatosensorische Wahrnehmung me-

chanischer Reize oder Hitzestimuli festgestellt werden (Abrahamsen *et al.*, 2008). Im Zusammenhang mit dieser hohen Spezifität und Relevanz für Schmerzen, wird Na_v1.8 als ein vielversprechendes Zielprotein für zukünftige Schmerztherapie und die Erforschung entsprechender Medikamente angesehen (Waxman & Zamponi, 2014).

1.5. Reaktive Spezies

Der Begriff „Reaktive Spezies“ (RS) gilt als Oberbegriff für äußerst reaktive chemische Verbindungen (Halliwell & Whiteman, 2004). Diese enthalten häufig Sauerstoff und werden daher auch als *reactive oxygen species* (ROS) bezeichnet, wie zum Beispiel H₂O₂, O₂⁻ oder OH[•]. Verbindungen, welche außerdem noch Stickstoff enthalten, werden unter dem Begriff *reactive nitrogen species* (RNS) zusammengefasst, zu denen zum Beispiel ONOO⁻ zählt. Allen diesen Spezies gemein ist das hohe oxidative Potenzial. Viele reaktive Spezies wie OH[•] sind radikalischer Natur. Da viele RS außerdem relativ kleine Moleküle sind, können sie Zellmembranen relativ gut passieren (Giorgio *et al.*, 2007). Möglicherweise tragen auch Anionenkanäle zur Vermittlung der guten Membranpermeabilität bei (Guskova *et al.*, 1984). In allen lebenden Organismen entstehen reaktive Spezies durch physiologische Prozesse wie beispielsweise die Isomerisierung von Disulfidbrücken durch die Proteindisulfid-Isomerase (Dickinson & Chang, 2011). Auch durch den Metabolismus entstehen reaktive Spezies, vor allem durch die Komplexe I (NADH-Dehydrogenase) und III (Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase) der oxidativen Phosphorylierung (Lenaz, 1998). Andererseits führen pathophysiologische Vorgänge, zum Beispiel körpereigene Abwehrreaktionen im Rahmen von Entzündungen, zur gesteigerten Produktion reaktiver Spezies (Mittal *et al.*, 2014). Diesbezüglich ist speziell die Familie der NADPH-Oxidasen zu nennen, deren einzige bisher bekannte Funktion in der Produktion von reaktiven Spezies zur zellulären Verteidigung besteht (Brandes *et al.*, 2014b) und die durch mechanische Stimuli aktiviert werden kann (Brandes *et al.*, 2014a).

Schon seit den 1950er Jahren ist bekannt, dass reaktive Spezies im Allgemeinen eine negative Wirkung auf Zellen haben, weil sie leicht mit DNA, Lipiden und Proteinen reagieren und diese dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigen oder schädigen (Commoner *et al.*, 1954). Aus diesem Grund werden reaktive Spezies mit der Entstehung von Krankheiten wie Krebs in Verbindung gebracht. Darüber hinaus gelten reaktive Spezies als Merkmal physiologischer Alterungsprozesse im Rahmen der „*free radical theory of aging*“ (Harman, 1992). Spätere Erkenntnisse ergaben hingegen, dass reaktive Spezies auch als Signalmoleküle beziehungsweise englisch *second messenger* wirken können (D’Autréaux & Toledano, 2007; Thannickal & Fanburg, 2000) und daher möglicherweise gar nicht ursächlich für Krankheiten und Altern sind, sondern wichtige Vermittler der

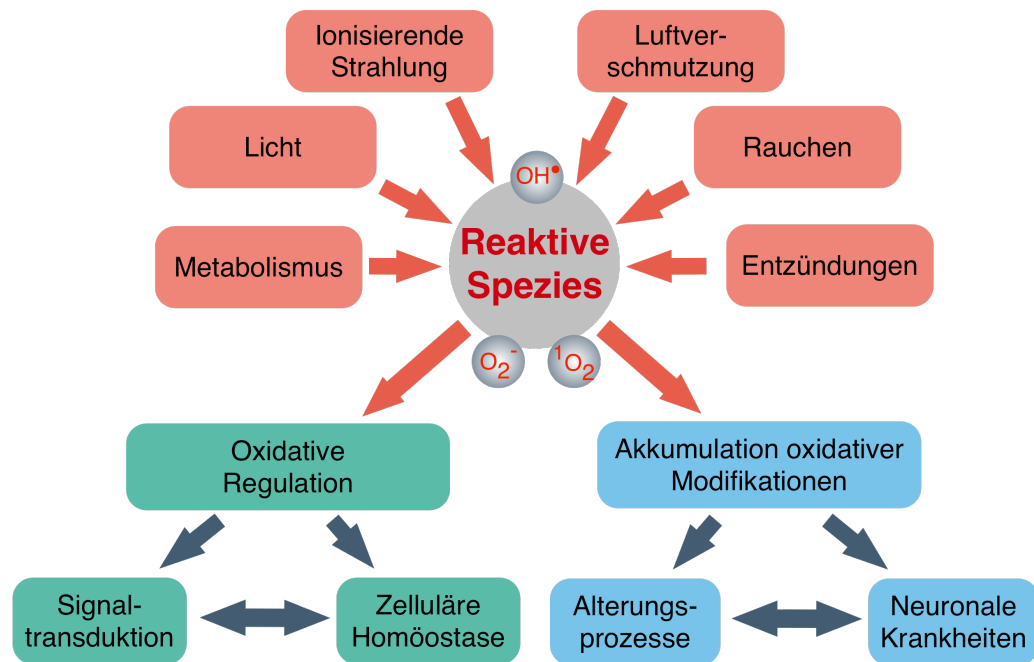


Abbildung 1.6.: Überblick über Ursachen und Folgen reaktiver Spezies. Risikofaktoren zur Erzeugung reaktiver Spezies (rot). In Abhängigkeit von Konzentration und Wirkdauer können reaktive Spezies einerseits regulatorische Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen (grün), andererseits aber auch an pathologischen Veränderungen des peripheren Nervensystem und Alterungsprozessen beteiligt sein (blau).

Stressantwort einer Zelle (Hekimi *et al.*, 2011). Über das Ausmaß der regulatorischen Funktion reaktiver Spezies ist bisher nur wenig bekannt (Ray *et al.*, 2012).

1.5.1. Reaktive Spezies und Neuropathien

Erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies werden unter anderem mit Neuropathien in Verbindung gebracht (Fidanboyu *et al.*, 2011; Ibi *et al.*, 2008). Mitverantwortlich für die vermehrte Generierung dieser reaktiven Spezies ist die NADPH-Oxidase 2 (Nox2) von Mikroglia-Zellen (Kim *et al.*, 2010), welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu DRG-Neuronen befinden. Des Weiteren kommt es durch die Aktivität von Nox4 in C-Fasern zu einem erhöhten Aufkommen reaktiver Spezies nach Nervenschäden, wodurch wiederum persistierende neuropathische Schmerzen ausgelöst werden (Kallenborn-Gerhardt *et al.*, 2012; Naik *et al.*, 2006). Substanzen, die als Radikalfänger agieren, konnten folglich experimentell einer gesteigerten Schmerzwahrnehmung entgegenwirken (Kim *et al.*, 2004). Weiterhin werden Alterungsprozesse mit erhöhten

Konzentrationen reaktiver Spezies in Verbindung gebracht (Liochev, 2013). Dabei häufen sich oxidierte Aminosäuren in allen Proteinen an (Höhn *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Enzym Methionin-Sulfoxidreduktase (MsrA), das Methioninsulfoxid wieder zu Methionin reduziert, in *Drosophila melanogaster* zu einer höheren Lebenserwartung führt (Ruan *et al.*, 2002). Mittlerweile existieren Anhaltspunkte, dass Ionenkanäle eine Schlüsselrolle bei der Verbindung der pathologischen Wirkung reaktiver Spezies mit Neuropathien einnehmen (Annunziato *et al.*, 2002; Sesti *et al.*, 2010).

1.5.2. Reaktive Spezies und Natriumkanäle

Wang konnte 1984 erstmals zeigen, dass die oxidative Modifikation von spannungsgesteuerten Natriumkanälen zum irreversiblen Verlust der Inaktivierung und demnach zu einer Änderung der Natriumkanalkinetik führt (Wang, 1984). Wie in Abbildung 1.7 dargestellt, enthalten spannungsgesteuerte Natriumkanäle viele der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein (Thiolgruppe) und Methionin (Thioethergruppe). Diese Aminosäuren können besonders leicht modifiziert und insbesondere oxidiert werden können (Berlett, 1997; Hoshi & Heinemann, 2001; Paulsen & Carroll, 2013). Es konnte nachgewiesen werden, dass die dramatische Verlangsamung der Inaktivierung von Natriumkanälen infolge von Oxidationen spezifisch auf die Modifikation des Methionins im IFM-Inaktivierungsmotiv zurückzuführen ist. Es gibt allerdings auch relevante Methionine an weiteren wichtigen Kanalpositionen wie zum Beispiel in der hydrophoben Interaktionsstelle des Inaktivierungsmotivs (Kassmann *et al.*, 2008; Quiñonez *et al.*, 1999). Die Ursache für die beobachteten Veränderungen wurde auf die geringere Flexibilität der Seitenkette von Methioninsulfoxid zurückgeführt, die zusätzlich weniger hydrophob als die von Methionin ist (Mary *et al.*, 2004).

1.6. Ziele der Arbeit

Neurone dorsaler Hinterwurzelganglien und die von ihnen gebildeten sensorischen Nerven sind integrale Schnittstellen zwischen peripherem und zentralen Nervensystem mit fundamentaler Bedeutung für die Weiterleitung somatischer Reize. Für die Signaltransduktion in sensorischen Nerven sind spannungsgesteuerte Natriumkanäle essentiell, da ihre Funktion Voraussetzung für Aktionspotenziale ist. Verschiedene physiologische Prozesse und pathophysiologische Zustände sind assoziiert mit einer erhöhten Produktion reaktiver Spezies im peripheren Nervensystems. Diese reaktiven Spezies wurden in der

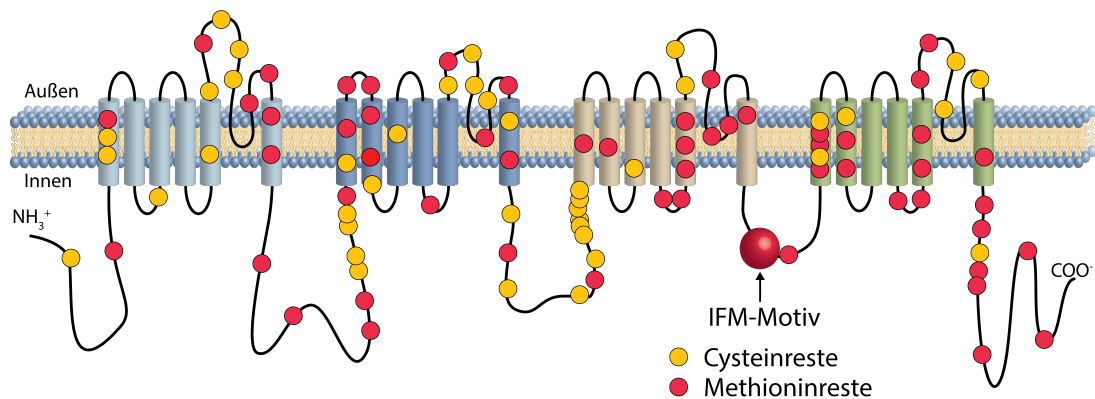
mNa_v1.8

Abbildung 1.7.: Topologiemodell des spannungsgesteuerten Natriumkanals Na_v1.8 der Maus. Cysteinreste (gelb) und Methioninreste (rot) sind entsprechend der Positionen in der Aminosäuresequenz von Na_v1.8 eingezeichnet.

Vergangenheit mit der veränderten Funktionalität spannungsgesteuerter Natriumkanäle in Verbindung gebracht.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob reaktive Spezies eine Änderung der elektrischen Aktivität von DRG-Neuronen herbeiführen und inwieweit oxidative Modifikationen spannungsgesteuerter Natriumkanäle dabei relevant sind.

Um die Veränderung elektrischer Signale beurteilen zu können, wurden repetitive und evozierte einzelne Aktionspotenziale in DRG-Neuronen der Maus untersucht. Reaktive Spezies wurden durch Oxidanzien wie Chloramin-T und die Bestrahlung mit blauem Licht erzeugt. Die Folgen der auf diese Weise produzierten reaktiven Spezies auf Aktionspotenziale wurden verglichen zwischen DRG-Neuronen von Wildtyp- und Na_v1.8^{-/-}-Mäusen, in denen der TTX-resistente Natriumkanal Na_v1.8^{-/-} funktionell inaktiviert war. Hiermit sollte speziell die Relevanz oxidativer Veränderungen an Na_v1.8 ermittelt werden. Dieser Kanal ist für den überwiegenden Teil des während eines Aktionspotenzials in DRG-Neuronen fließenden Natriumstroms verantwortlich.

Mit DRG-Neuronen von Na_v1.9^{-/-}-Mäusen und der Substanz TTX war es weiterhin möglich, gezielt Änderungen der Stromantwort von Na_v1.8 infolge des Einflusses reaktiver Spezies zu untersuchen.

Weiterhin sollte die Wirkweise der verschiedenen reaktiven Spezies und mögliche Angriffsorte am Kanal Na_v1.8 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden unter anderem Antioxidanzien eingesetzt.

Des Weiteren wurden Natriumkanalchimären heterolog in ND7/23-Zellen ausgeprägt und elektrophysiologisch untersucht. Bei diesen Chimären waren unterschiedliche Do-

mänen funktioneller Na_v1.8-Kanäle gegen die entsprechenden Domänen des TTX-sensitiven Natriumkanals Na_v1.4 ausgetauscht worden. Die Chimären wurden zusätzlich mit Aminosäureaustauschen verwendet, die zu unterschiedlicher Oxidationsempfindlichkeit der Kanalinaktivierung führten, um Aussagen zur möglichen Unterschiede in der oxidativen Modulation der Prozesse Kanalöffnung und Inaktivierung treffen zu können.

2. Methoden

2.1. Chemikalien

Wenn nicht anders benannt, wurden alle Chemikalien, die zur Herstellung von Lösungen verwendet wurden, in hoher Reinheit von der Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe oder der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, erworben und Zellkulturmedien von der Life Technologies GmbH, Darmstadt verwendet.

2.2. Sequenzalignierung

Für Sequenzalignierungen wurden die in der Tabelle 2.1 aufgeführten Aminosäuresequenzen der Natriumkanäle der Arten *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* aus der NCBI GenBank verwendet. Die Sequenzen wurden in das Programm UGENE (UniPro, Novosibirsk, Russland) exportiert. Zur Ermittlung der Aminosäuresequenzidentität der Natriumkanäle von *Mus musculus* wurde mit dem PHYLIB Neighbor Joining-Algorithmus (Felsenstein, 1989), auf Basis des Jones-Taylor-Thornton-Distanzmatrix-Modells, ein phylogenetischer Baum erstellt (Jones *et al.*, 1992). Um konservierte und nicht-konservierte Cystein- und Methioninreste von rNa_V1.8 zu ermitteln, wurden die Aminosäuresequenzen der *Rattus norvegicus*-Varianten der Natriumkanäle mit Hilfe des MUSCLE-Algorithmus aligniert (Edgar, 2004).

Spezies	Kanaltyp und Accession-Nummer in der GenBank
<i>Mus musculus</i>	Na _V 1.8: NP_001192250, Na _V 1.1: NP_061203, Na _V 1.2: NP_001092768, Na _V 1.3: NP_061202, Na _V 1.4: NP_573462, Na _V 1.5: NP_001240789, Na _V 1.6: NP_001070967, Na _V 1.7: NP_001277603, Na _V 1.9: NP_036017
<i>Rattus norvegicus</i>	Na _V 1.8: NP_058943, Na _V 1.1: NP_110502, Na _V 1.2: NP_036779, Na _V 1.3: NP_037251, Na _V 1.4: NP_037310, Na _V 1.5: NP_037257, Na _V 1.6: NP_062139, Na _V 1.7: NP_579823, Na _V 1.9: NP_062138
<i>Homo sapiens</i>	Na _V 1.8: NP_006505

Tabelle 2.1.: Zur Ermittlung von Sequenzidentitäten und Konsensussequenzen verwendete Proteine und deren Aminosäuresequenz-Identifikationsnummer in der GenBank.

2.3. Präparation von DRG-Neuronen

Neben Wildtyp-Mäusen standen durch Zerfügungstellung von Prof. John Wood (University College London) zwei weitere C57BL/6-Mauslinien zur Verfügung, bei denen der $\text{Na}_V1.8$ - oder der $\text{Na}_V1.9$ -Kanal funktionell inaktiviert worden waren, im Folgenden genannt $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ und $\text{Na}_V1.9^{-/-}$ (Akopian *et al.*, 1999; Amaya *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde von Prof. Jakob Moskovitz (University of Kansas) eine Mauslinie zur Verfügung gestellt, bei der das Methioninsulfoxid-reduzierende Enzym MSRA fehlte ($\text{MSRA}^{-/-}$, Moskovitz *et al.*, 2001). Die Mäuse wurden vom Tierhaus des Forschungszentrums des Universitätsklinikums Jena entsprechend der Thüringer Tierschutzgesetze bis zum Zeitpunkt der Präparation versorgt.

Sämtliche Mäuse wurden mit Hilfe von aus Schwanzbiopsien aufgereinigter DNA per Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf den korrekten Genotyp überprüft. Dabei fanden zwei *primer*-Kombinationen Verwendung, die unterschiedlich große, spezifische Amplifikationsprodukte ergaben. So konnte entweder eine eindeutig identifizierbare Gelbande bei Vorhandensein der für die *knock out*-Mäuse typischen Neomycinkassette oder eine andere Bande bei Vorhandensein des jeweiligen Kanalgens nachgewiesen werden (*primer*-Sequenzen unter Appendix A). Nur im Fall heterozygoter Mäuse, die nicht für Experimente verwendet wurden, konnten beide Amplifikationsprodukte aus einer DNA-Extraktion nachgewiesen werden.

Die verwendeten Mäuse waren 15 bis 45 Wochen alt und wurden nach demselben Protokoll wie folgt präpariert: Die jeweilige Maus wurde mit Diethylether anästhesiert und anschließend per Genickbruch getötet. Danach wurde die Maus auf einem Präparationstisch fixiert und die Haut am Rücken vom Schwanzansatz aus kranial entfernt. Die Wirbelsäule wurde anschließend entnommen, zweigeteilt und jede Hälfte in eine Plastischale gefüllt mit CSS-Lösung (in mM: 137 NaCl, 5,3 KCl, 5,3 MgCl_2 , 3 CaCl_2 , 25 Sorbitol, 10 HEPES; pH 7,2 mit NaOH) überführt. Im Anschluss wurde unter dem Mikroskop graue sowie weiße Substanz aus jeder Wirbelsäulenhälfte entfernt, wodurch die einzelnen dorsalen Hinterwurzelganglien lokalisiert, von ihren Axonen getrennt und herauspräpariert werden konnten. Alle Ganglien wurden in einem 2-ml-Reaktionsröhrchen mit CSS-Lösung auf Eis bis zur Weiterbehandlung aufbewahrt. Nach kurzer Zentrifugation von 4 min bei 700 g wurde die überschüssige CSS-Lösung entnommen und 1,5 ml einer Lösung des *Liberase Blendzyme TH* (Roche Life Science, Mannheim) hinzugegeben und bei 37 °C für 20 min in einem Rotationsinkubator inkubiert. Selbige Prozedur wurde mit einem zweiten *Liberase Blendzyme, TM* (ebd.), wiederholt, wobei 10 min bei 37 °C inkubiert wurde. Beide *Liberase*-Enzyme enthalten hochreine Mengen von Kollagenase I und II und zusätzlich Thermolysin, um die DRG-Neuronen von Nervenfaserresten und

assoziiertem Gewebe zu trennen. Nach einer letzten Zentrifugation wurden die Ganglien zur Inhibition der *Liberase*-Enzyme in einer mit Trypsin-Inhibitor versetzten Lösung aufgenommen und durch Trituierung vereinzelt. Final wurden die DRG-Neuronen auf Poly-D-Ornithin-beschichtete und durch UV-Licht sterilisierte, runde Deckgläschen in einer mit DRG-Medium (89 % DMEM/F12, 4,5 g/l D-Glukose + Glutamax, 10 % fötales Kälberserum, 4 % Penicillin/Streptomycin) befüllten 24-*well*-Platte verteilt. Für Experimente mit dem Immersionsölobjektiv des Mikroskops wurden die Zellen auf 8 Glasplättchen verteilt, die zuvor mit RTV (RTV 615, KVD, Bad Wimpfen, Deutschland) in ausgefräste Plastischälchen geklebt worden waren, um so durch den direkten Kontakt zum Glasplättchen auch das Immersionsölobjektiv nutzen zu können.

Bis zur Messung wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator aufbewahrt. Zur elektrophysiologischen Untersuchung wurden die Deckgläschen mit den DRG-Neuronen zügig in ein Plastischälchen mit Badlösung definierter Ionenkonzentrationen (siehe Abschnitt 2.5.2 und 2.5.3) überführt und in die passende Objekthalterung des Mikroskops eingelegt. Im Falle der geklebten Plättchen wurde das Medium abgesaugt, das Schälchen daraufhin mit Badlösung gewaschen und schließlich mit 2 ml Badlösung aufgefüllt und ebenso in die Objekthalterung eingesetzt.

2.4. Heterologe Expression von Natriumkanalchimären

Um funktionelle Unterschiede der Auswirkung von reaktiven Spezies auf TTX-resistente und TTX-sensitive Kanäle molekular eingrenzen zu können, wurden verschiedene Natriumkanalchimären heterolog in ND7/23-Zellen ausgeprägt.

2.4.1. Eingesetzte Natriumkanalchimären

Zur heterologen Expression standen die Gene *Scn4A* (UniProtKB: P15390; Trimmer *et al.*, 1989) und *Scn10A* (UniProtKB: Q62968; Akopian *et al.*, 1996) zur Verfügung, welche die Kanalproteine Na_v1.4 und Na_v1.8 von *Rattus norvegicus* kodieren, im Folgenden als „rNa_v1.4“ und „rNa_v1.8“ bezeichnet. Weiterhin waren bereits verschiedene chimäre Konstrukte der Gene dieser beiden Kanalproteine vorhanden, deren exprimierte Proteinkomposition in Abbildung 2.1 vereinfacht dargestellt ist. Sämtliche Konstrukte, bei denen die Domäne I von dem Kanal rNa_v1.4 stammte, wurden in einer Variante mit der Mutation Y401S verwendet (Leipold *et al.*, 2011; Schirmeyer, 2007), wodurch die sonst TTX-sensitiven Kanäle TTX-resistent waren. Weiterhin wurden Kanalchimären untersucht bei denen ein Aminosäureaustausch von Methionin zu Cystein im IFM-Inaktivie-

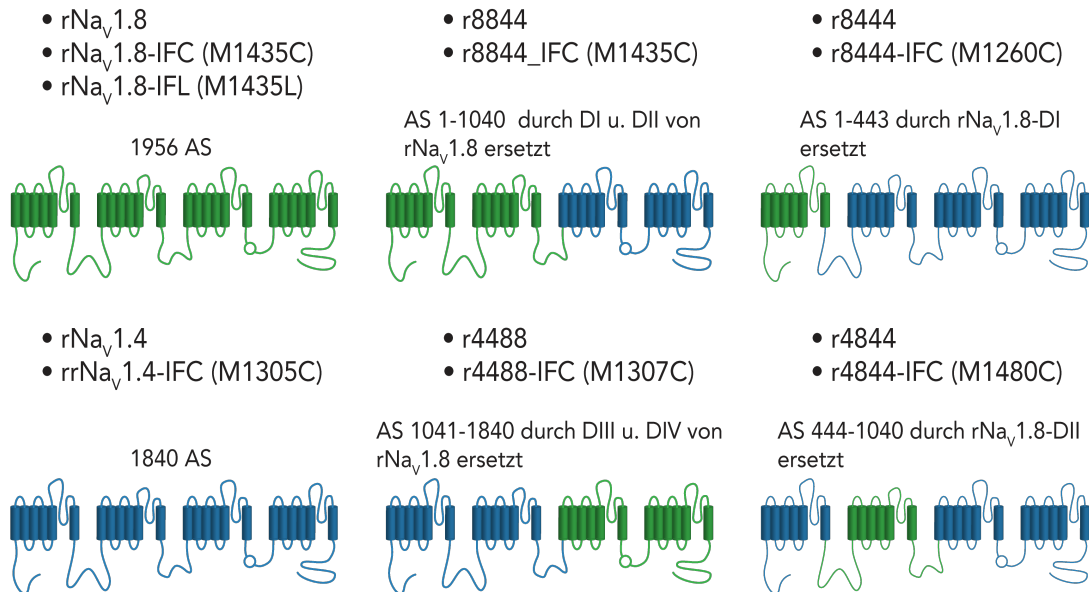


Abbildung 2.1.: Verwendete chimäre Natriumkanäle aus rNa_v1.8 und rNa_v1.4. In Klammern ist der entsprechende Aminosäureaustausch angegeben. Über den Kanalmodellen ist der jeweils zutreffende Austausch von Aminosäuren des Kanals rNa_v1.4 gegen die entsprechenden Aminosäuren des Kanals rNa_v1.8 angegeben. Nicht angegeben ist der Aminosäureaustausch Y401S aller Kanäle, bei denen Domäne I von rNa_v1.4 stammte, um TTX-Resistenz zu gewährleisten.

rungrungsmotiv vorlag („IFC“, Schirmeyer, 2014) und eine „Na_v1.8-IFL“ genannte Chimäre, bei der das Methionin des IFM-Inaktivierungsmotivs gegen ein Leucin getauscht wurde (ebd.). Alle verwendeten Plasmide hatten den Expressionsvektor *pcDNA3* zur Grundlage.

2.4.2. Zellkultur und Elektroporation

Das Gen *Scn10A* für den Kanal Na_v1.8 ist dafür bekannt, einzig in nervenzellähnlichen Zelllinien überhaupt exprimiert zu werden. Aus diesem Grund wurden ND7/23-Zellen verwendet, die den vorher verwendeten DRG-Neuronen am ähnlichsten sind. Diese Zelllinie wurde von Wood *et al.* als Hybridzelllinie aus DRG-Neuronen der Ratte und dem Maus-Neuroblastom N18Tg2 entwickelt und zeigt Eigenschaften sensorischer Nervenzellen (Wood *et al.*, 1990).

Die ND7/23-Zellen wurden bei 37 °C und 10 % CO₂ mit DMEM-Medium (4,5 g/l D-Glukose), das mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) versetzt war, inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von etwa 70 % bis 90 % erreicht hatten, wurde einmalig mit PBS gewaschen und anschließend Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %) zugegeben und 3 min ein-

wirken lassen. Dann wurden die Zellen mit 10 ml des DMEM-Mediums in der Zellkulturflasche abgelöst und mit einer Pipette trituiert. Je nach anfänglicher Konfluenz wurden danach 1 ml bis 2 ml der Zellsuspension in bis zu drei neue Zellkulturflaschen überführt, in die bereits 20 ml DMEM (+10 % FKS) vorgelegt waren. Die restliche Zellsuspension wurde in ein 10-ml-Plastikröhrchen gegeben und 4 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das überschüssige Medium abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml PBS aufgenommen. Entsprechend der Anzahl der Transfektionsansätze wurde diese Zelllösung auf 1,5-ml-Reaktionsröhrchen verteilt. Nach einer erneuten Zentrifugation von 4 min bei 500 g wurde der Überstand abgenommen.

Um eine verlässliche und gleichbleibend hohe Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde auf die Elektroporation mit Hilfe des 4D-Nucleofector und des dazugehörigen *SF Cell Line 4D-Nucleofector X-Kits* (Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland) zurückgegriffen. Das Zellpellet aus der vorangegangenen Zellkultur wurde daraufhin in einen kurz vorher vorbereiteten Transfektionsansatz, bestehend aus 16,4 µl Puffer, 3,6 µl Supplement, 0,5 µg mitgeliefertem pmaxGFP und 5 µg des jeweiligen Kanal-Plasmids aufgenommen. Danach wurden die Ansätze in einzelne Kammern einer Nucleocuvette-Platte überführt und durch den 4D-Nucleofector elektroporiert. Als Erholungsschritt wurden die Zellen daraufhin in der Nucleocuvette -Platte mit 130 µl RPMI-Medium versehen und 5 min inkubiert (wie oben beschrieben). Zum Schluss wurden die transfizierten Zellen auf Deckglässchen in den Kammern einer 24-well-Platte verteilt, die mit je 1 ml DMEM (+10 % FKS) und 3 % Penicillin/Streptomycin befüllt war. Eine ausreichende Proteinbildung zur elektrophysiologischen Untersuchung war meist am zweiten oder dritten Tag nach der Transfektion erreicht.

2.5. Die *patch clamp*-Methode

Basierend auf der Methode der Spannungsklemme (Cole, 1949; Hodgkin & Huxley, 1952; Marmont, 1949) wurde 1976 die *patch clamp*-Methode von Neher und Sakmann entwickelt. Durch diese Methode ist es mit nur einer elektrolytgefüllten Glasmikroelektrode möglich, einem Membranfleck (englisch *patch*) oder auch der ganzen Zelle gezielt Spannungen aufzuzwingen, die schnell geändert werden können. Somit können Ströme durch die Zellmembran gemessen werden. Die Methode wurde 1980 und 1981 weiter verbessert und erweitert und ist in dieser Form bis heute ein Fundament der Elektrophysiologie (Hamill *et al.*, 1981; Sigworth & Neher, 1980).

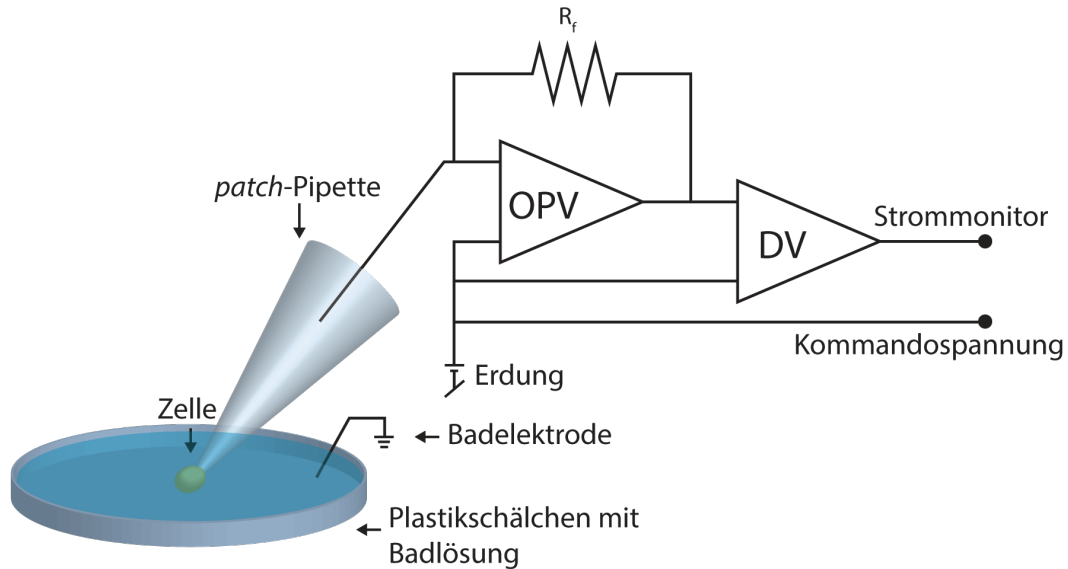


Abbildung 2.2.: Messaufbau zur Durchführung der patch clamp-Technik. Ein Silber-Silberchloriddraht taucht in die *patch*-Pipette ein, die elektrischen Kontakt zur Zelle hat. Der Draht ist mit einem Operationsverstärker (OPV) verbunden, der kontinuierlich dafür sorgt, dass die Membranspannung der gewählten Kommandospannung entspricht. Die Ausgangsspannung des OPV liegt an einem Differentialverstärker (DV) an, dessen Ausgangssignal schließlich an einem Computer visualisiert werden kann (siehe Abschnitt 2.5.1).

2.5.1. Prinzip und Messaufbau

Die Glasmikroelektrode, auch *patch*-Pipette genannt, weist einen Öffnungsdurchmesser von wenigen Mikrometern an der Spitze auf. Sie wird in Kontakt mit der Zellmembran gebracht, wodurch sich ein hochohmiger Widerstand herstellt (englisch *Gigaseal*) und ein Membranfleck eingeschlossen wird. Durch das kurzzeitige Aufbauen von Unterdruck in der *patch*-Pipette kann der Membranfleck nun eingesaugt werden, um die komplette Zelle elektrisch zu klemmen (Ganzzell-Ableitung). Dafür taucht in die *patch*-Pipettenlösung ein Silber-Silberchloriddraht ein, der mit einem Verstärker verbunden ist (siehe Abb. 2.2). Dieser sorgt dafür, dass das Membranpotenzial der Zelle einem vorgegebenen Kommandopotenzial angeglichen wird. Die Signale des Verstärkers können schließlich computergesteuert aufgezeichnet werden.

Im vorliegenden experimentellen Aufbau wurde mit einem EPC10-Verstärker von HEKA (HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland) und einem invertierten Mikroskop (Axio Observer.A1, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) gearbeitet. Glasmikroelektroden wurden aus Borosilikatglas hergestellt und anschließend mit RTV beschichtet, um die Kapazität der Elektrode zu verringern. Abschließend wurden die *patch*-Pi-

petten mit Hitze poliert. Die Badlösung war mit der Badelektrode über eine Agarbrücke (1,5 % Agar, 3 M KCl) elektrisch verbunden, um Redoxreaktionen an der Elektrode zu verhindern. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur (21 °C bis 24 °C) an kleinen DRG-Neuronen (mittlere Membrankapazität = $12,75 \pm 0,03$ pF, $n = 287$) innerhalb von 1 bis 2 Tagen nach der Präparation durchgeführt.

2.5.2. Ganzzell-Stromklemme

Zur Durchführung von Experimenten mit der Ganzzell-Stromklemme wurde folgende Lösung im Bad eingesetzt (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂ und 10 HEPES; pH 7.3 mit NaOH. In der Intrazellulärlösung befanden sich (in mM): 140 KCl, 0,5 EGTA, 5 HEPES und 3 Mg-ATP; pH 7,3 mit KOH. Das Diffusionspotenzial der Lösungen wurde bestimmt, indem eine *patch*-Pipette mit Badlösung befüllt und in die Badlösung eingetaucht wurde. Nach einem Potenzialabgleich wurde diese *patch*-Pipette durch eine mit Intrazellulärlösung befüllte *patch*-Pipette ersetzt, welche wiederum eingetaucht wurde. Dadurch konnte das Diffusionspotenzial zwischen beiden Lösungen am Spannungsmonitor abgelesen werden. Es betrug 3 mV und wurde von den Ergebnissen subtrahiert. Für die Ganzzell-Stromklemme wurden *patch*-Pipetten mit Widerständen in Badlösung von 1,5 MΩ bis 3 MΩ verwandt. Nach Erreichen des *Gigaseal* an der Zellmembran wurde die schnelle Kapazität automatisch abgeglichen. Anschließend wurde durch kurzzeitigen Unterdruck in der *patch*-Pipette die Membran durchbrochen und mit -83 mV in den Ganzzell-Spannungsklemmenmodus geschaltet. Daraufhin wurde die Kapazität der Zellmembran abgeglichen. Für Experimente mit repetitiven Aktionspotenzialen wurde anschließend in den Stromklemmenmodus gewechselt und der injizierte Strom umgehend auf 0 pA eingestellt, sodass das tatsächliche Ruhepotenzial an der Zelle anlag. Neuronen, die in dieser Einstellung bereits spontan feuerten und somit depolarisierten, wurden verworfen. In Neuronen mit stabilem Ruhepotenzial wurde für 1 s ein Strom von etwa 10 pA bis 50 pA injiziert, durch den etwa 5 bis 15 Aktionspotenziale ausgelöst werden konnten. Dieser Frequenzbereich wurde gewählt, um eine frequenzabhängige Depression zu vermeiden. Die Brückenmessung (englisch *bridge balance*) zur Korrektur von Widerstandsartefakten, die von dem Widerstand der *patch*-Pipettenöffnung zur Zelle herühren, wurde für alle Stromklemmen-Experimente auf 90 % bis 100 % eingestellt.

Im Falle der Messung von Einzelaktionspotenzialen wurde nach dem Wechsel in den Stromklemmenmodus eine langsame Spannungsklemme (englisch *low-frequency-voltage clamp*) auf -83 mV hinzugeschaltet, die das Membranpotenzial im Hintergrund der Stromklemme auf -83 mV festsetzt, um Stabilität und zuverlässiges Auslösen einzelner Aktionspotenziale zu gewährleisten (Lüscher *et al.*, 1994a). Anschließend wurde die

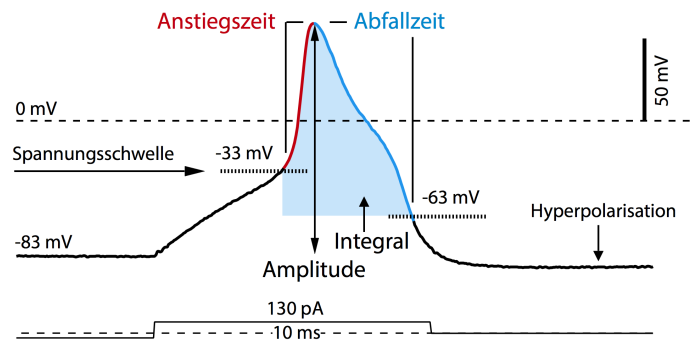


Abbildung 2.3.: Beispielhaftes Aktionspotenzial in Wildtyp-DRG-Neuronen. Das Aktionspotenzial wurde von einem Haltepotenzial von -83 mV mit einer Strominjektion von 130 pA ausgelöst. Markiert sind alle Parameter, so wie in der vorliegenden Arbeit definiert. Im Beispiel beträgt die Anstiegszeit (rot) $0,97$ ms, die Abfallzeit (blau) $3,57$ ms, das Integral (hellblau) $290,0 \mu\text{V s}^{-1}$, die Amplitude $140,0$ mV, die Spannungsschwelle $-33,8$ mV und die Hyperpolarisation $-91,6$ mV. Ein solches Aktionspotenzial wurde alle 10 s stimuliert, um Änderungen über der Zeit verfolgen zu können.

Stromschwelle zum Auslösen des Aktionspotenzials ermittelt, indem angefangen bei einer Injektion von 0 pA für 10 ms, der injizierte Strom alle 10 s um 10 pA erhöht wurde. Danach wurde ein Protokoll gestartet bei dem alle 10 s ein Aktionspotenzial mit einer konstanten Strominjektion von mindestens 50 pA über der Stromschwelle ausgelöst wurde, typischerweise 50 pA bis 175 pA. Dadurch konnten Änderungen von Aktionspotenzialen über der Zeit verfolgt werden. Sämtliche Aktionspotenzialdaten wurden mit einem Verstärkungsfaktor von $0,1 \text{ pA mV}^{-1}$ und einer Abtastrate von 20 kHz aufgenommen und nicht gefiltert.

Als Amplitude des Aktionspotenzials ist die Differenz aus Ruhepotenzial und maximal erreichter Spannung bezeichnet. Die Spannungsschwelle zur Auslösung eines Aktionspotenzials wurde definiert als die Spannung bei der ein Spannungsanstieg von 20 V/s während des Aktionspotenzialaufstrichs überschritten wurde. Als „Hyperpolarisation“ wurde im Folgenden die minimale Spannung während der Hyperpolarisationsphase benannt. Diese Parameter wurden hauptsächlich verwendet, um Unterschiede von Aktionspotenzialen von Neuronen aus gentechnisch veränderten Mäusen beziehungsweise bei der Verwendung zusätzlicher Substanzen in der Intrazellulärlösung beurteilen zu können.

Um die Änderung von Aktionspotenzialen durch reaktive Spezies bewerten zu können, wurden vor allem folgende Parameter analysiert: Die Anstiegszeit wurde ausgehend von einem Potenzial von -33 mV bis zur positivsten Spannung des Aktionspotenzials

(Maximum) gemessen, um einen Großteil der unterschwelligen kapazitiven Ladephase auszuschließen. Die Abfallzeit wurde vom Maximum des Aktionspotenzials bis zu einer Spannung von -63 mV in der Fallphase ermittelt, um teils stark variierende Fallzeiten bis zur Hyperpolarisation auszuschließen. Weiterhin wurde zwischen den beiden beschriebenen festgelegten Potenzialen von -33 mV und -63 mV das Integral des Aktionspotenzials bestimmt, um die kombinierte Änderung von Anstiegs- und Abfallphase unter Berücksichtigung eventueller Änderungen der Aktionspotenzialform bewerten zu können (siehe Abb. 2.3).

2.5.3. Ganzzell-Spannungsklemme

Zur Durchführung von Experimenten mit der Ganzzell-Spannungsklemme wurde folgende Lösung im Bad eingesetzt (in mM): 35 Cholin-Cl, 100 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 Glukose und 10 HEPES, pH 7,3 mit NaOH. In der Intrazellulärlösung befanden sich (in mM): 140 CsF, 10 NaCl, 2 MgCl₂, 0,1 CaCl₂, 1,1 EGTA und 10 HEPES; pH 7,2 mit CsOH. Das Diffusionspotenzial der Lösungen (gemessen wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben) betrug 6 mV und wurde von den Ergebnissen subtrahiert. *Patch*-Pipetten mit Widerständen in Badlösung von 1 M Ω bis 1,8 M Ω wurden für diese Konfiguration verwandt. Nach Erreichen eines *on cell-Gigaseal* wurde wie bereits beschrieben vorgegangen und die Membran bei -86 mV im Ganzzellspannungsklemmenmodus durchbrochen und anschließend das Haltepotenzial von -106 mV oder -126 mV eingestellt. Danach wurde alle 30 s bis 60 s eine Testdepolarisation auf -6 mV durchgeführt bis zum Erreichen einer stabilen Stromantwort nach ungefähr 5 min bis 10 min. Sämtliche Daten in dieser Konfiguration wurden mit einem Verstärkungsfaktor von 500 μ V pA⁻¹ und einer Abtastrate von 25 kHz aufgenommen und mit einem Tiefpass-Besselfilter mit 5 kHz gefiltert. Der Serienwiderstand wurde zu mindestens 70 % kompensiert. Lineare Leckströme wurden mit einem P/N-Leckstromprotokoll abgezogen, das sechs dem eigentlichen Spannungssprung vorausgehende Pulse derselben Dauer enthielt, wobei deren Amplitude einem Sechstel des Spannungssprungs entsprach.

Um Na_V1.8-Ströme zu messen, wurden Neurone von Na_V1.9^{-/-}-Mäusen verwendet. Mit 300 nM TTX in der Badlösung konnten damit Na_V1.8-Ströme isoliert werden. Das Haltepotenzial wurde hierbei auf -126 mV festgesetzt. Um TTX-s-Ströme zu messen, wurden Neuronen von Na_V1.8^{-/-}-Mäusen verwendet. Na_V1.8^{-/-}-Neuronen mit signifikantem Anteil des zusätzlich vorhandenen Kanals Na_V1.9 zu Beginn der Messung wurden verworfen. Für die Messung TTX-s-Ströme wurde für einige Minuten ein Haltepotenzial von -86 mV an die Neuronen angelegt, bevor ein ein Haltepotenzial von -106 mV

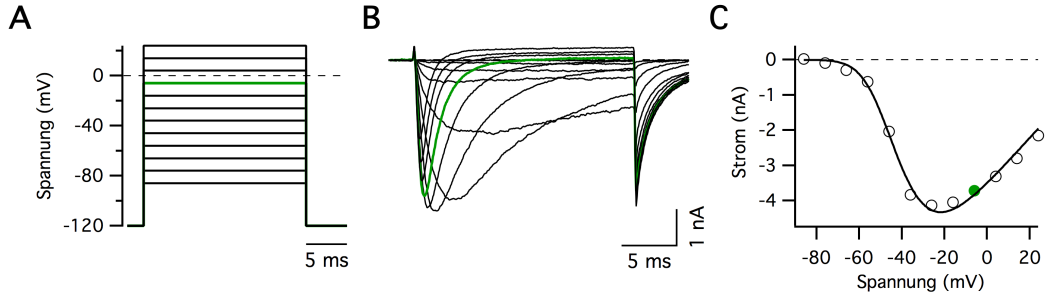


Abbildung 2.4.: Strom-Spannungsbeziehung am Beispiel von Na_v1.8 **A)** Spannungsprotokoll zur Ermittlung von Strom-Spannungsbeziehungen mit Depolarisationen ausgehend von -126 mV auf -86 mV bis 24 mV in 10 -mV-Schritten. **B)** Stromantwort von Na_v1.8 auf das genannte Protokoll. **C)** Strom-Spannungskurve der Stromantwort aus **B** mit Anpassung nach Gleichung 2.1. Im Beispiel beträgt die Spannung der halbmaximalen Aktivierung $V_m = -54,4$ mV und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung $k_m = 9,9$ mV. Die Testspannung von -6 mV beziehungsweise die Stromantwort darauf ist grün markiert.

festgelegt wurde. Dies diente der Minimierung verbleibender Na_v1.9-Ströme. Das Haltepotenzial zur Messung der Natriumkanalchimären in ND7/23-Zellen betrug -126 mV.

Anschließend wurde mit Hilfe eines Strom-Spannungs-Protokolls ausgehend von einem Haltepotenzial von -126 mV für 20 ms eine Spannung angelegt, die alle 10 s in 10 mV-Schritten im Bereich von -86 mV bis $+24$ mV positiver eingestellt wurde (siehe Abb. 2.4 A). Durch Auftragen des Maximalstroms gegen die jeweilige Testspannung erhielt man eine charakteristische Strom-Spannungskurve, die nach folgender Formel angepasst werden konnte:

$$I(V) = \frac{\Gamma \cdot (V - E_{rev})}{(1 + e^{-((V - V_m)/k_m)})^3} \quad (2.1)$$

$I(V)$ ist der Strom in Abhängigkeit von der Spannung, Γ die maximale Leitfähigkeit, E_{rev} das Umkehrpotenzial (festgehalten auf $+53$ mV), V_m die halbmaximale Aktivierungsspannung und k_m die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung. Letztere zwei Parameter sind wichtige Kenngrößen zur Beschreibung der spannungsgesteuerten Öffnung von Natriumkanälen (siehe auch Abb. 2.4 C).

Zur Darstellung der Anpassung von gemittelten und normierten $I(V)$ -Kurven von Na_v1.8- und TTX-s-Strömen von DRG-Neuronen vor und nach der jeweiligen Behandlung mit reaktiven Spezies wurde folgende Formel im Rahmen einer globalen Anpassung gewählt:

$$I(V) = \Gamma \cdot \left(\frac{r \cdot (V - E_{rev})}{(1 + e^{-((V - V_{m1})/k_{m1})})^3} + \frac{(1 - r) \cdot (V - E_{rev})}{(1 + e^{-((V - V_{m2})/k_{m2})})^3} \right) \quad (2.2)$$

V_{m1} und k_{m1} beziehungsweise V_{m2} und k_{m2} stehen für die halbmaximale Aktivierungsspannung und Spannungsabhängigkeit vor und nach der Behandlung. Der Faktor r gibt das Verhältnis beider Zustände nach der Behandlung an. Das Umkehrpotenzial E_{rev} wurde festgehalten auf +53 mV.

Um Informationen über die Gleichgewichtsinaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle zu gewinnen, wurde ein Spannungsprotokoll verwendet, bei dem ausgehend von einem Haltepotenzial von –126 mV alle 10 s eine Testspannung von –6 mV für 10 ms angelegt wurde. Darauf folgte für 500 ms eine Spannung, die in 5-mV-Schritten beginnend bei –136 mV bis –6 mV positiver wurde. Anschließend erfolgte ein weiterer Spannungssprung auf –6 mV für 10 ms (siehe Abb. 2.5) A).

Das Verhältnis der Maximalströme I_2 und I_1 , ausgelöst durch den zweiten beziehungsweise ersten 20-ms-Spannungssprung auf –6 mV, wurde gegen die Spannung V_{inact} aufgetragen, die zwischen den beiden Spannungssprüngen über 500 ms geklemmt wurde. Auf diese Weise ergab sich eine Boltzmann-Kurve, die nach folgender Gleichung angepasst werden konnte:

$$\frac{I_2}{I_1} = \frac{h_{max} - h_{off}}{(1 + e^{-(V-V_h)/k_h})} + h_{off} \quad (2.3)$$

h_{max} ist die maximale Kanalverfügbarkeit und h_{off} eine Variable, die für in einigen Fällen selbst nach sehr positiven V_{inact} -Spannungen verbleibenden Reststrom I_2 kompensiert. V_h die Spannung der halbmaximalen Inaktivierung und k_h die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (siehe auch 2.5 C).

Um Veränderungen der Stromantwort über der Zeit in Folge experimenteller Behandlung bei verschiedenen Testspannungen nachvollziehen zu können, wurde alle 5 s ein Spannungsprotokoll mit aufeinanderfolgenden Testspannungen auf –26 mV, –6 mV und +4 mV für 20 ms ausgeführt, wobei zwischen den Testspannungen für 20 ms das Haltepotenzial von –126 mV angelegt wurde. Ausgewertet wurden für alle Depolarisationen die jeweiligen Maximalströme sowie das Inaktivierungsverhalten mit Hilfe folgender Formel:

$$R_i = \frac{\int_{t_{peak}}^{20 \text{ ms}} I(t) dt}{I_{peak}(20 \text{ ms} - t_{peak})} \quad (2.4)$$

R_i ist der Inaktivierungsindex, I_{peak} der Maximalstrom und t_{peak} der Zeitpunkt des Maximalstroms. Indem das Verhältnis des tatsächlichen Stromintegrals gegenüber dem hypothetischen Stromintegral bei vollständig abwesender Kanalinaktivierung ausgewertet

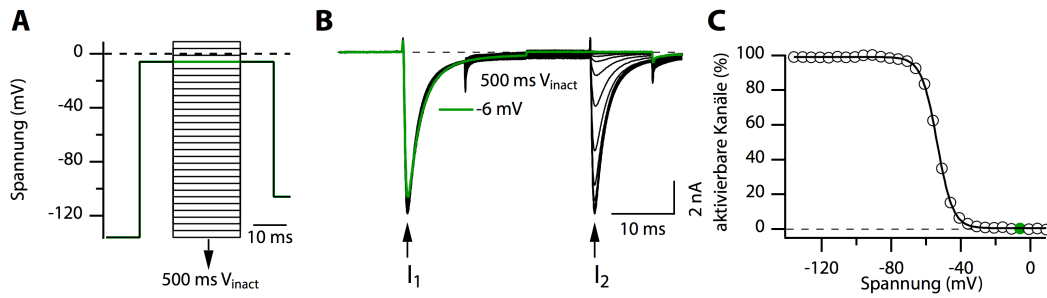


Abbildung 2.5.: Gleichgewichtsinaktivierung am Beispiel von $\text{Na}_V1.8$ **A)** Spannungsprotokoll zur Ermittlung von Strom-Spannungsbeziehungen mit Depolarisationen ausgehend von -126 mV auf -86 mV bis 24 mV in 10-mV -Schritten. **B)** Stromantwort von $\text{Na}_V1.8$ auf das genannte Protokoll. **C)** Strom-Spannungskurve der Stromantwort aus **B** mit Anpassung nach Gleichung 2.3. Im Beispiel beträgt die Spannung der halbmaximalen Inaktivierung $V_h = -53,7 \text{ mV}$ und die Spannungsabhängigkeit $k_h = 4,5 \text{ mV}$. Grün markiert ist die Spannung beziehungsweise die Stromantwort und die Fraktion aktivierbarer Kanäle für eine Inaktivierungsspannung von -6 mV zwischen den beiden 10-ms -Testspannungen von -6 mV .

wurde, konnten mögliche störende Einflüsse von Änderungen der Kanalaktivierung auf den Inaktivierungsparameter R_i ausgeschlossen werden.

Der Übersichtlichkeit halber werden im Ergebnisteil nur die Ergebnisse der Depolarisationen auf -26 mV und $+4 \text{ mV}$ gezeigt.

2.6. Erzeugung reaktiver Spezies

Reaktive Spezies wurden auf verschiedene Weise erzeugt, unter anderem durch die äußere Applikation von Oxidanzien beziehungsweise deren Hinzufügen zur Extrazellulärlösung oder durch die Bestrahlung einzelner Zellen mit blauem Licht.

2.6.1. Oxidanzien

Als verhältnismäßig mildes Oxidans in biologischen beziehungsweise elektrophysiologischen Experimenten (Huang *et al.*, 1987; Wang, 1984) wurde Chloramin-T verwandt. Es weist eine hohe Stabilität in wässrigen Lösungen auf. Chloramin-T reagiert spezifisch mit den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und insbesondere Methionin. Hierbei entstehen Cystein-Sulfensäure und Methionin-Sulfoxid (Shechter *et al.*, 1975). Die milde oxidative Wirkung sowie die Spezifität für Cysteine und Methionine sind vergleichbar mit den durch die Myeloperoxidase produzierten und physiologisch relevanten Chloraminen (Winterbourn, 2008). In wässrigen Lösungen liegt Chloramin-T in einem kompli-

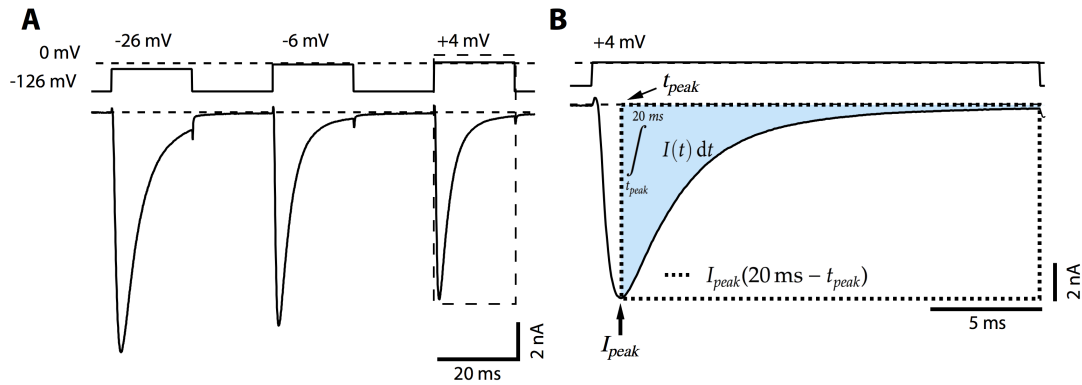


Abbildung 2.6.: Repräsentative Stromspur von $\text{Na}_v1.8$ in $\text{Na}_v1.9^{-/-}$ -DRG-Neuronen. A)

Typischer $\text{Na}_v1.8$ -Strom ausgelöst durch das abgebildete Spannungsprotokoll. Dieses Protokoll wurde alle 5 s wiederholt, um Änderungen über der Zeit zu verfolgen. **B)** Vergrößerte Darstellung der Stromantwort auf den Spannungssprung auf +4 mV und gewählte mathematische Beschreibung des tatsächlichen Stromintegrals ab t_{peak} und des hypothetischen Stromintegrals, würde der Kanal keine Inaktivierung besitzen (gestricheltes Rechteck). Das Verhältnis dieser beiden Kenngrößen diene der Beschreibung des Inaktivierungsverhaltens (siehe Gleichung 2.4). I_{peak} ist der Maximalstrom und t_{peak} der Zeitpunkt des Maximalstroms.

zierten Gleichgewicht vor (Gottardi, 1992), in dem das membranpermeable Chloramin-T-Ion die größte oxidative Wirkung hat und deshalb als reaktive, oxidierende Spezies gilt (Rangappa *et al.*, 2002). Chlorierungen durch Chloramin-T sind aufgrund der extrem geringen Konzentrationen von hypochlorigen Gleichgewichtsprodukten bei annähernd neutralen pH-Werten selbst in gesättigten Chlorid-Lösungen ausgeschlossen (Gottardi, 1992; Hahn *et al.*, 1994).

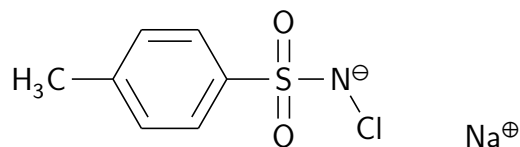


Abbildung 2.7.: Struktur von Chloramin-T als Natriumsalz.

Chloramin-T wurde experimentell in der jeweiligen Badlösung bis zu einer Konzentration von 10 μM beziehungsweise 100 μM verdünnt und in eine zweite Glaspipette mit etwa 10-fachem Öffnungsdurchmesser einer *patch*-Pipette gefüllt. Mit Hilfe eines zweiten Mikromanipulators wurde diese *patch*-Pipette in räumliche Nähe zur jeweiligen Zelle gebracht, wobei ein Überdruck von ca. 1 cm H_2O einen stetigen Flüssigkeitsausstrom gewährleistete (Abb. 2.8). Durch diese ausschließlich lokale Perfusion ist es möglich,

nacheinander auch mehrere Zellen einer Plastikschaale zu vermessen. Alternativ wurden 10 ml einer mit 10 μM beziehungsweise 100 μM Chloramin-T versetzten Badlösung mit einer Pasteur-Pipette in die Plastikschaale appliziert, wobei überschüssige Lösung auf der gegenüberliegenden Seite der Schale durch einen Schlauch entfernt wurde, der an eine Absaugvorrichtung angeschlossen war. Der komplette Austausch des Bads verursacht weniger mechanische Störungen nahe der Zelle, jedoch muss das Plastikschälchen und das Glasplättchen anschließend getauscht werden. Beide Methoden erzielten eine etwa gleich schnelle Erhöhung der Chloramin-T-Konzentration in der Umgebung der zu beobachtenden Zelle.

In gleicher Weise wurde bei der Applikation von H_2O_2 und *tert*-Butylhydroperoxid (tBHP) vorgegangen, außer dass diese beiden Substanzen in einer Konzentration von 100 μM genutzt wurden. H_2O_2 gilt als physiologisches Oxidans, das endogen bei der Reduktion reaktiverer Spezies wie Superoxid (O_2^-) durch die Enzyme Superoxiddismutase (SOD) und Katalase entsteht und nicht-enzymatisch infolge der Oxidation von Vitamin C und Vitamin E entstehen kann (Giorgio *et al.*, 2007). H_2O_2 reagiert präferentiell mit Cysteinen und Methioninen (Shechter *et al.*, 1975). Das außerdem verwendete tBHP oxidiert im Gegensatz zu H_2O_2 selbst in millimolarer Konzentration mit hoher Spezifität nur Methionine und Cysteine an der Proteinoberfläche. Aus diesem Grund kann tBHP verwendet werden, um die oxidative Zugänglichkeit dieser beiden Aminosäuren in Abhängigkeit von ihrer Position innerhalb von Proteinen zu prüfen (Keck, 1996).

2.6.2. Bestrahlung mit blauem Licht

Als weitere Methode der Erzeugung reaktiver Spezies wurde die Bestrahlung der zu vermessenden Zellen mit blauem Licht unterschiedlicher Strahlungsleistung verwendet. Dadurch werden mechanische Störungen der Zellen verhindert, welche durch Applikation oder Badaustausch auftreten können.

Bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht niedriger Strahlungsleistung werden vor allem intrazelluläre Chromophore angeregt, hauptsächlich Flavine (Eichler *et al.*, 2005; Massey, 2000). Bei der Rückkehr aus dem angeregten Zustand übertragen diese Chromophore ein freies Elektron an umliegende Moleküle wie zum Beispiel Wasser, wodurch diese reaktiv werden. Dies führt innerhalb von Sekunden zu einem schnellen Anstieg der Konzentration reaktiver Spezies innerhalb der Zelle (Ojha *et al.*, 2014). Untersuchungen mit Hilfe von Elektronenspinresonanz und Luminol ergaben, dass es sich bei den auf diese Weise produzierten reaktiven Spezies hauptsächlich um H_2O_2 , O_2^- und $^1\text{O}_2$ handelt (Lavi *et al.*, 2003).

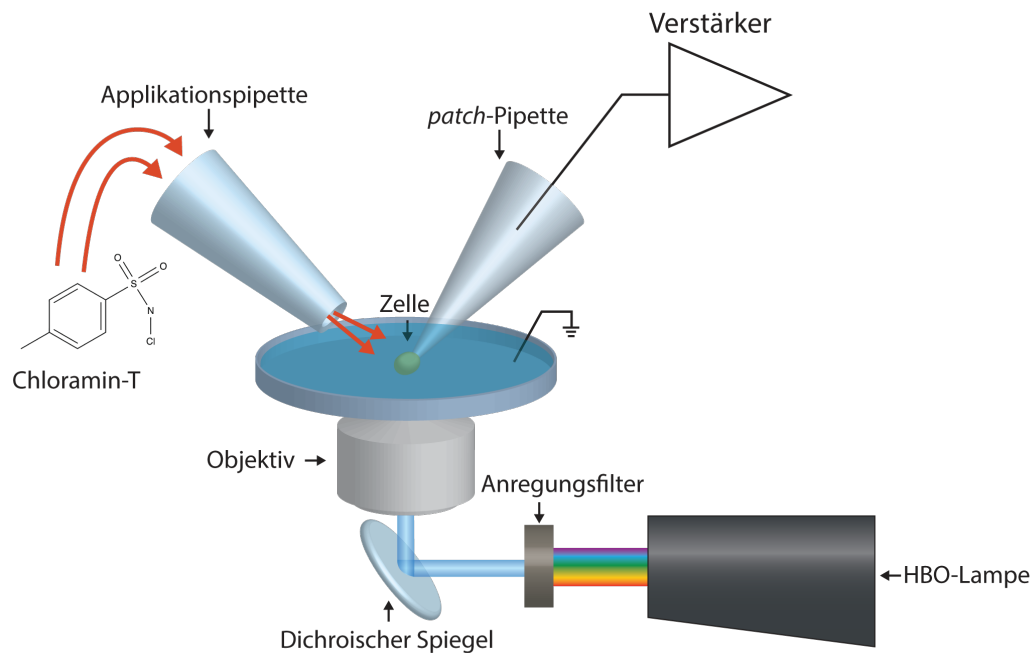


Abbildung 2.8.: Die Erzeugung reaktiver Spezies. Applikation von Chloramin-T über eine zweite Pipette mit größerem Öffnungsdurchmesser als die *patch*-Pipette in unmittelbarer Nähe der zu vermessenden Zelle (links, siehe Abschnitt 2.6.1) oder Bestrahlung der Zelle mit Blaulicht (unten, siehe Abschnitt 2.6.2). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu; das bestrahlte Volumen war um ein vielfaches größer als das der Zelle.

Eine 100 W-HBO Lampe diente als Lichtquelle, die über den Epifluoreszenz-Kanal direkt an das oben genannte Fluoreszenzmikroskop angeschlossen wurde. Ein Filtersatz für das *green fluorescent protein* (GFP) war in den Strahlengang eingebaut (Filter Set 38, Anregungsfilter: 470/40 nm, Strahlteiler bei 495 nm, Emissionsfilter: 525/50; Carl Zeiss AG). Somit gelangte durch das Objektiv nur Licht der Wellenlängen 450 nm bis 490 nm. Es wurde mit zwei verschiedenen Strahlungsleistungen gearbeitet, die mit Hilfe zweier verschiedener Objektive eingestellt wurden. Die Beleuchtung unter der Verwendung eines 20-fach vergrößernden Luftobjektivs (Objektiv LD A-Plan, 20x/0.3 Ph1, NA 0.3) wurde im Folgenden als „Blaulicht niedriger Strahlungsleistung“ deklariert. In dieser Konfiguration wurde ein Sensor (Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) auf eine Detektionswellenlänge von 470 nm eingestellt und auf Höhe der Plastikschälchen über dem Objektiv positioniert. Mit dem zum Sensor gehörigen optischen Leistungsmessgeräts PM100D konnte eine Strahlungsleistung von 4 mW gemessen werden. Wurde stattdessen das 63-fach-Immersionsöl-Objektiv (Apochromat 63x/1.4 Oil M27, NA=1.4) ver-

wendet, wurde dies im Folgenden als „Blaulicht hoher Strahlungsleistung“ bezeichnet. Aufgrund der Verwendung von Immersionsöl in den folgenden Experimenten wurde auf eine Messung der Strahlungsleistung verzichtet.

2.6.3. *Lucifer yellow*

Des Weiteren wurde in angezeigten Experimenten der gut wasserlösliche und nicht-toxische Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer yellow* (LY) in der Intrazellulärlösung verwendet (Stewart, 1978), der zur Zellmarkierung eingesetzt wird. Bei Bestrahlung mit blauem Licht (Absorptionsmaximum bei 427 nm) zerfällt LY in diverse äußerst reaktive Spezies (Higure *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wird die Beleuchtung von Zellen, die vorher mit millimolaren Konzentrationen von *Lucifer yellow* geladen wurden, sogar zu deren gezielter Ausschaltung beziehungsweise Vernichtung genutzt (Miller & Selverston, 1979). Der genaue Mechanismus beziehungsweise die spezifischen reaktiven Abbauprodukte sind jedoch unbekannt. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass auch Redox-unabhängige Prozesse wie zum Beispiel starke Hitzeentwicklung infolge der Beleuchtung zur Wirkung *Lucifer yellows* beitragen (ebd.).

2.6.4. Antioxidanzien

Um die möglicherweise schützende Wirkung reduzierender Substanzen vor den oxidativen Modifikationen von Chloramin-T und blauem Licht zu prüfen, wurde die *patch*-Pipette in angegebenen Experimenten vor dem Befüllen mit Intrazellulärlösung in mit 2 mM Dithiothreitol (DTT) versetzte Intrazellulärlösung getaucht. DTT ist ein membranpermeables, starkes Reduktionsmittel, welches sowohl durch Chloramin-T als auch durch Licht entstehende reaktive Spezies neutralisieren kann und die Oxidation von Aminosäuren verhindert (Cleland, 1964; Redpath, 1973). Weiterhin wurde in gekennzeichneten Experimenten auch mit 2 mM DTT in der Badlösung gearbeitet.

Die Verwendung von DTT war während der Aufnahme von Aktionspotenzialen nicht möglich, da Aktionspotenziale in Gegenwart von DTT unter anderem starke Schwankungen des Ruhepotenzials zeigten, obwohl dieses im Hintergrund geklemmt wurde. Aus diesem Grund wurde in diesen Experimenten 3 mM Ascorbinsäure zur Intrazellulärlösung hinzugefügt und der pH-Wert erneut auf 7,3 eingestellt. Ascorbinsäure ist ein natürliches Antioxidationsmittel, das physiologisch in Konzentrationen von 1 mM bis 10 mM intrazellulär auftritt (Eck *et al.*, 2013). Im Gegensatz zu Vitamin E, das bei Kontakt zu reaktiven Spezies selbst zu einem Tocopheroxyl-Radikal reagiert, ist das oxidative Endprodukt von Ascorbinsäure ein Gleichgewicht aus wenig reaktiver Dehydroascorbinsäure und regenerierter Ascorbinsäure (Winterbourn, 2008).

2.6.5. DTNB

In einer Experimentreihe wurde die Badlösung mit 100 μM der membranimpermeablen Substanz 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) versetzt, welches eine spezifische Bindung mit zugänglichen Thiolgruppen von Cysteinresten eingeht (Ellman, 1959). Die modifizierten Cysteinreste sind somit unangreifbar für nachfolgende Oxidationen (Tawfik, 2009). Durch die Membranimpermeabilität können gezielt Cysteine auf der Außen- oder der Innenseite der Zellmembran modifiziert werden.

2.7. Datenanalyse

Sämtliche elektrophysiologische Messdaten wurden bei 3 kHz digital gefiltert und mit dem Programm FitMaster (HEKA Elektronik) exportiert. Anschließend wurden die Daten in IgorPro (WaveMetrics, Lake Oswego, USA) mit Hilfe eigens erstellter Programmroutinen ausgewertet.

Für jedes Experiment wurde der Durchschnitt der auszuwertenden Parameter, gemittelt über 20 s vor der experimentellen Behandlung mit reaktiven Spezies, als Wert „vor der Behandlung“ beziehungsweise als Kontrolle angenommen (siehe Abb. 2.9). Der Durchschnitt der Aufnahmen von 140 s bis 160 s nach der Behandlung wurde als Vergleichswert „nach 150 s“ definiert.

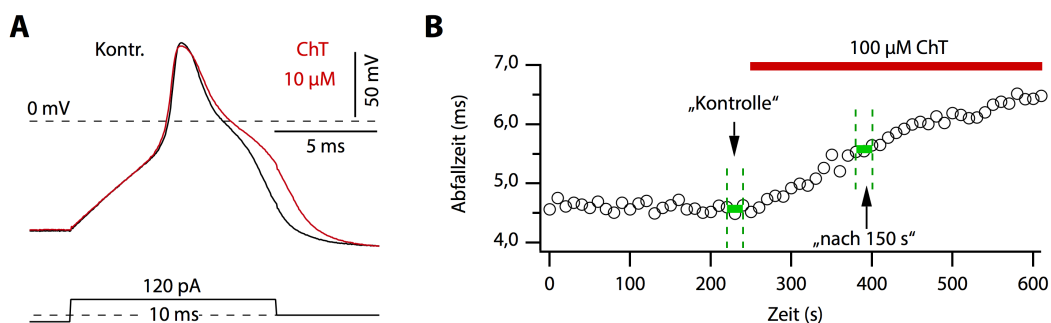


Abbildung 2.9.: Analyse der Änderung von Parametern über der Zeit. A) Aktionspotential von Wildtyp-DRG-Neuronen vor und nach Behandlung mit 100 μM ChT. **B)** Verlauf der Abfallzeit während der Perfusion mit 100 μM ChT-haltiger Badlösung. Die gemittelten Werte über einen Zeitraum von 20 s vor der Behandlung wurde als Referenzwert gewählt. Die gemittelten Werte von Sekunde 140 bis 160 wurden als „nach 150 s“ definiert. Analog wurden alle anderen Parameter inklusive der Ströme aus Spannungsklemmen-Experimenten ausgewertet.

Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte der jeweiligen absoluten Parameter vorher und nachher oder die der relativen Parameterän-

derungen in Prozent oder als x-fache Änderung. Die Daten wurden mit Hilfe des Jarque-Bera-Tests auf Normalverteilung geprüft und anschließend im Fall repetitiver Aktionspotenziale mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, sonst mit dem Student'schen t-Test, bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verglichen. Ergaben diese Tests Signifikanzwerte (p-Werte) unter 0,05, wurde von einem signifikanten Unterschied ausgegangen.

3. Ergebnisse

Im dieser Arbeit wurde mit Hilfe der *patch clamp*-Methode untersucht, wie sich reaktive Spezies auf elektrophysiologische Eigenschaften von Neuronen dorsaler Hinterwurzelganglien der Maus auswirken. Speziell wurde die zeitliche Änderung von Aktionspotentialen und Strömen durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle infolge der Behandlung mit reaktiven Spezies untersucht.

Reaktive Spezies wurden dabei einerseits erzeugt durch Chloramin-T, einem milden Oxidans mit Spezifität für Methionin, welches physiologisch produzierten Chloraminen ähnelt (Pero *et al.*, 1996; Shechter *et al.*, 1975). Vorherige Studien an spannungsgesteuerten Natriumkanälen hatten ergeben, dass 100 μM bis 1 mM ChT zu substanziellen Änderungen in der Inaktivierungskinetik der Kanäle führen (Kassmann *et al.*, 2008). Um auch Informationen über die Auswirkungen von verhältnismäßig mildem Stress zu erlangen, wurde Chloramin-T in Konzentration von 10 μM bis 100 μM verwendet.

Als weitere Möglichkeit der Erzeugung reaktiver Spezies wurde die Blaulichtbestrahlung gewählt, die den Vorteil der Abwesenheit mechanischer Irritationen besitzt. Hierbei wurden Einzelzellen mit Blaulicht in einem Wellenlängenbereich von 450 nm bis 490 nm bestrahlt. Eine niedrige Strahlungsleistung wurde mit einem 20x-Objektiv erreicht und eine vergleichsweise hohe Strahlungsleistung mit einem 63x-Objektiv.

3.1. Reaktive Spezies vermindern die Frequenz repetitiver Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen

Der Informationsfluss von der Peripherie ins ZNS wird in Form repetitiver Aktionspotenziale verwirklicht. Um den Einfluss von reaktiven Spezies auf diese repetitiven Aktionspotenziale zu untersuchen, wurde alle 10 s ein geringer Strom 1 s lang in das zu vermessende Neuron injiziert. Dies bewirkte das verlässliche Auslösen von sich wiederholenden Aktionspotentialen mit einer Frequenz von ungefähr 5 Hz bis 15 Hz. Es wurden nur Neuronen verwendet, deren Amplitude und Ruhepotential während der Messung bis zur Behandlung mit reaktiven Spezies konstant waren. In $\text{Na}_v 1.8^{-/-}$ -Neuronen war es zwar teilweise auch möglich repetitive Aktionspotenziale auszulösen, jedoch brauchten diese bei gleichbleibendem Stimulus innerhalb weniger Wiederholungen zusammen. Den folgenden Ergebnissen liegen daher Experimente an Wildtyp-Neuronen zugrunde.

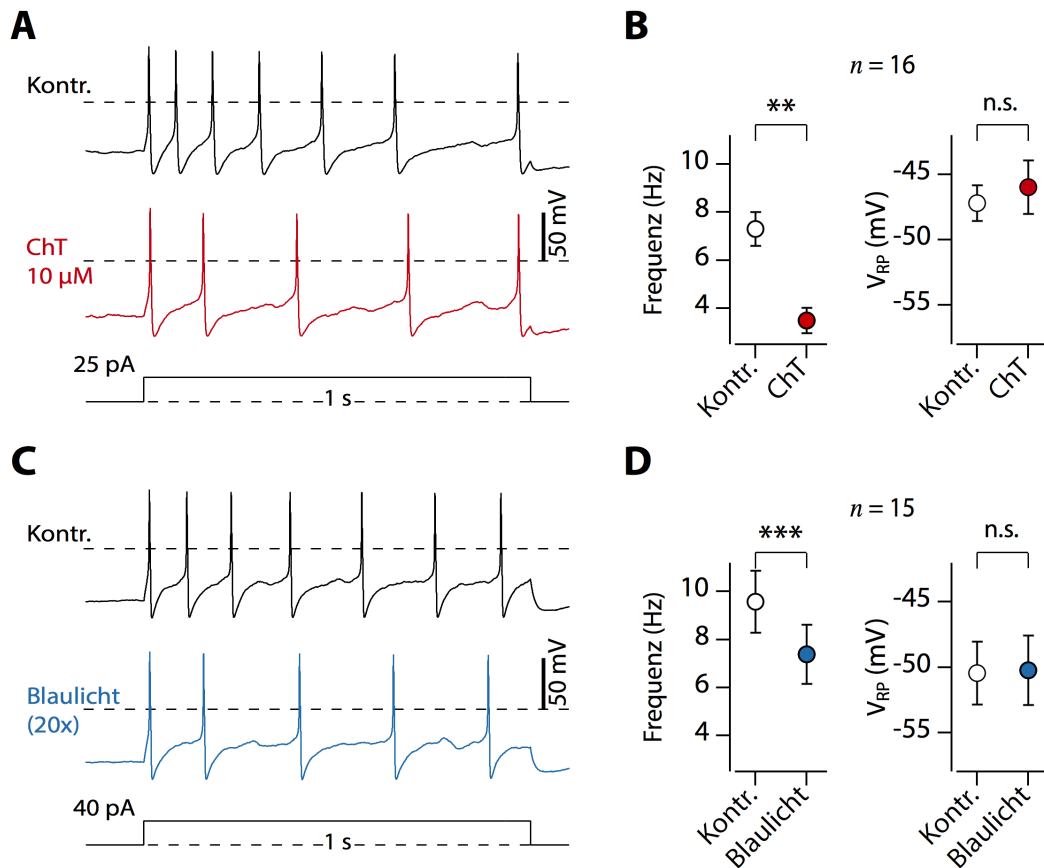


Abbildung 3.1.: Wirkung von reaktiven Spezies auf repetitive Aktionspotenziale. Repräsentative Aktionspotenziale vor und nach Behandlung mit 10 µM ChT (**A**) oder Blaulicht niedriger Strahlungsleistung (**C**). Durchschnittlicher Effekt von Chloramin-T (**B**) und Blaulicht (**D**) auf die Aktionspotenzial-Frequenz (links) und das Ruhepotenzial (rechts) nach 150 s. Anzahl der gemessenen Zellen jeweils über den Abbildungen.

Wie in Abbildung 3.1 **B** gezeigt, verminderte sich die Aktionspotenzialfrequenz infolge der Applikation von 10 µM Chloramin-T von $7,3 \pm 0,7$ Hz auf $3,5 \pm 0,5$ Hz ($p = 0,0011$) innerhalb von 150 s. Durch Bestrahlung mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung verringerte sich die Frequenz von $9,6 \pm 1,3$ Hz auf $7,4 \pm 1,3$ Hz ($p = 0,0007$; Abb. 3.1 **D**). Das durchschnittliche Intervall zwischen den einzelnen Aktionspotenzialen einer Aktionspotenzialserie verlängerte sich im selben Zeitraum im Fall von ChT von $152,1 \pm 12,4$ ms auf $234,8 \pm 20,3$ ms ($p = 0,0002$). Die Blaulichtbehandlung führte zu einer absoluten Verlängerung des Intervalls von $132,8 \pm 14,4$ ms auf $182,5 \pm 28,9$ ms ($p = 0,038$). Die Korrelation von verminderter Frequenz und erhöhter Intervalldauer zeigt, dass die Anzahl der Aktionspotenziale pro Sekunde gleichmäßig reduziert wurde und nicht etwa nur die letzten Aktionspotenziale einer Aktionspotenzialserie nicht mehr aus-

gelöst wurden. Das zeigt indirekt, dass beispielsweise weder eine gravierende Depolarisation während des einsekündigen Pulses auftrat, noch die Schwelle zum Auslösen von Aktionspotenzialen deutlich angehoben wurde. Weiterhin änderten sich auch weder das durchschnittliche Aktionspotenzialmaximum noch -minimum innerhalb der Aktionspotenzialserien infolge beider Behandlungen ($p > 0,05$). Das Ruhepotenzial, gemessen als Mittel der Spannung von 100 ms vor Einsetzen des Stimulus bis zu dessen Beginn, veränderte sich nach beiden Behandlungen ebenso nicht ($p > 0,05$), was diesen Parameter als Ursache der Verminderung der Aktionspotenzialfrequenz ausschließt. Die durchschnittliche Spannungsschwelle von $-25,98 \pm 1,29$ mV änderte sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.2. Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen

Um spezifischere Informationen über den Einfluss reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale zu erlangen, wurden einzelne Aktionspotenziale kontrolliert von einem im Hintergrund angelegten Potenzial von -83 mV alle 10 s ausgelöst, was das verlässliche Auslösen von Aktionspotenzialen ermöglichte (Lüscher *et al.*, 1994a). Änderungen des Ruhepotenzials können in dieser Einstellung zwar nicht verfolgt werden, erschienen aber angesichts der fehlenden Änderung des Ruhepotenzials bei den vorangegangenen Messreihen mit repetitiven Aktionspotenzialen sehr unwahrscheinlich. Außerdem konnte auf diese Weise durch das konstante Startniveau die Fluktuation der Anstiegszeit sowie der Amplitude verringert werden.

3.2.1. Überblick über Aktionspotenziale von Wildtyp- und $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -DRG-Neuronen der Maus

Der spannungsgesteuerte Natriumkanal $\text{Na}_V1.8$ ist in DRG-Neuronen verantwortlich für den überwiegenden Teil des während des Aktionspotenzialaufstrichs fließenden Natriumstroms. Deshalb wurde die Wirkung geringer Konzentrationen reaktiver Spezies auf Wildtyp- und $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -DRG-Neuronen verglichen, um so die Rolle von $\text{Na}_V1.8$ bei der Vermittlung der Antwort gegenüber reaktiven Spezies bewerten zu können. Im Gegensatz zu repetitiven Aktionspotenzialen konnten stimulierte Aktionspotenziale auch in $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen über eine Zeitspanne von mehreren Minuten verlässlich ausgelöst werden, das heißt ohne signifikante Änderung von charakteristischen Parametern wie der Aktionspotenzialamplitude oder der Anstiegs- und Abfallzeit. So war es mög-

3.2. Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen

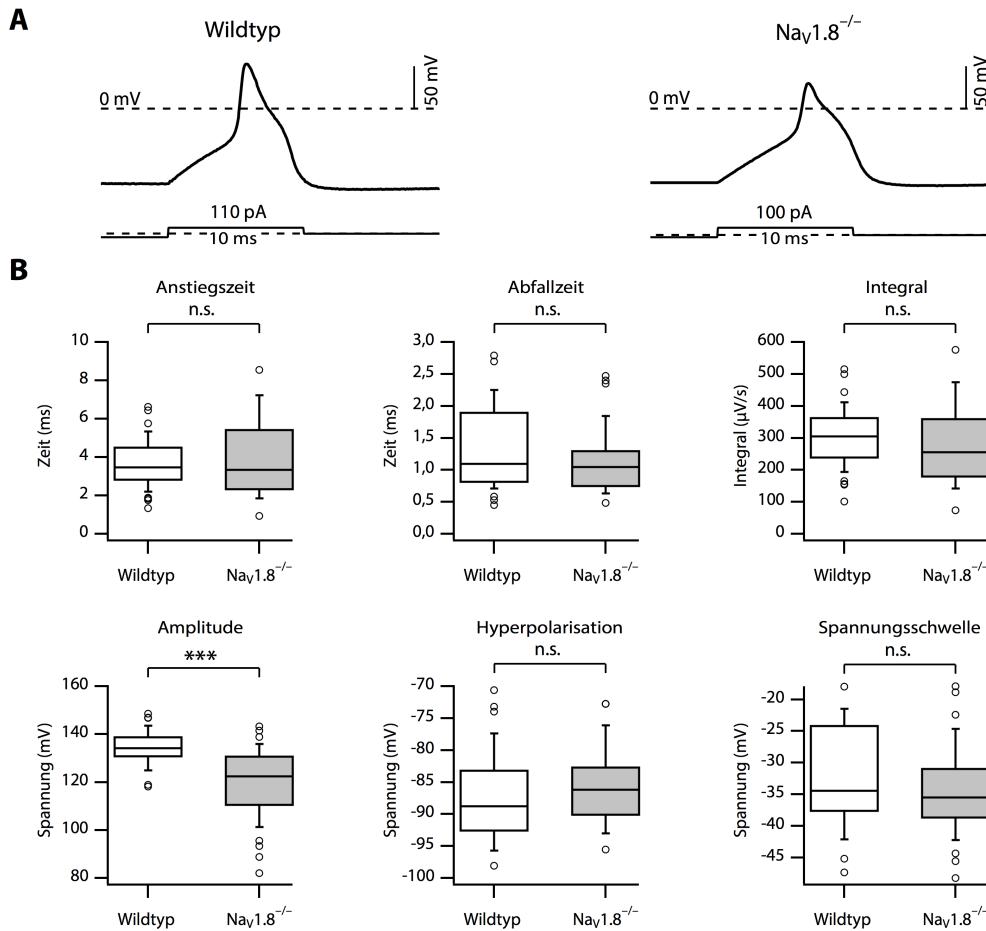


Abbildung 3.2.: Vergleich der Aktionspotenziale von Wildtyp- und Na_V1.8^{-/-}-Neuronen.

A) Je ein repräsentatives Aktionspotenzial von einem Wildtyp-Neuron (links) und von einem Na_V1.8^{-/-}-Neuron (rechts). **B)** Box-Whisker-Darstellung von Anstiegszeit, Abfallzeit, Integral, Amplitude, minimaler Spannung während der Hyperpolarisation und der Spannungsschwelle der Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen (nicht gefüllt, $n = 48$) und Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (grau gefüllt, $n = 53$). Eingeflossen sind alle ausgewerteten Aktionspotenziale von Neuronen der späteren Licht- und Chloramin-T-Messreihen, in denen keine weiteren modifizierenden Substanzen zugegeben wurden.

lich, die Wirkung reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale über der Zeit zwischen Wildtyp-Neuronen und Na_V1.8^{-/-}-Neuronen zu vergleichen.

Abbildung 3.2 **A** zeigt repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp- und Na_V1.8^{-/-}-Neuronen. Die Aktionspotenziale in Na_V1.8^{-/-}-Neuronen weisen eine größere Streuung in Bezug auf die Anstiegszeit, das Integral und der Amplitude auf. Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen sind dafür stärker gestreut hinsichtlich der Abfallzeit, der minimalen Spannung während der Hyperpolarisation und der Spannungsschwelle. Es gibt im Mit-

tel allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -DRG-Neuronen, mit Ausnahme der Amplitude: $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen erreichen im Schnitt, ausgehend von dem vorgegebenen Haltepotenzial von -83 mV , eine Aktionspotenzialamplitude von $123,1 \pm 1,9 \text{ mV}$, gegenüber $137,6 \pm 1,0 \text{ mV}$ in Wildtyp-Neuronen ($p = 2 \cdot 10^{-7}$).

Die durchschnittliche Spannungsschwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen beiden Neuronenarten ($p = 0,122$). Aktionspotenziale von $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen hatten eine Spannungsschwelle von durchschnittlich $-32,4 \pm 1,1 \text{ mV}$, im Vergleich zu $-34,6 \pm 0,9 \text{ mV}$ bei Wildtyp-Neuronen.

3.2.2. Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale in Wildtyp-Neuronen stärker als in $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen

Bereits $10 \mu\text{M}$ Chloramin-T bewirkten eine sichtbare Verbreiterung des Aktionspotenzials (siehe Abb. 3.3 A, oben links). Um diese Änderung an stimulierten Aktionspotenzialen einzuschätzen, wurde die integrierte Spannung zwischen dem Zeitpunkt des Überschreitens von -33 mV der Aufstrichphase und -63 mV der Abfallphase des Aktionspotenzials gemessen. Wie in Abbildung 3.3 B gezeigt, führte die Behandlung von DRG-Neuronen von Wildtyp-Mäusen mit $10 \mu\text{M}$ ChT zu einer Vergrößerung dieses „Integral“ benannten Parameters um $12,4 \pm 2,3 \%$ ($p = 3 \cdot 10^{-5}$). Da die Amplitude sich währenddessen nur marginal änderte ($< 2,5 \pm 1,0 \text{ mV}$; $p = 0,039$), kommt dieser Effekt einer Verbreiterung des Aktionspotenzials gleich.

Zur genaueren Spezifikation im Hinblick auf die Veränderung des Integrals wurden zwei Zeitkonstanten betrachtet: Die Anstiegszeit von -33 mV der Aufstrichphase bis zum Aktionspotenzialmaximum und die Abfallzeit vom Maximum bis zu -63 mV der Fallphase.

Durch $10 \mu\text{M}$ ChT wurde die Anstiegszeit nicht signifikant geändert ($p = 0,09$). Die Abfallzeit verlängerte sich hingegen signifikant um $15,1 \pm 3,6 \%$ ($p = 0,0003$). Eine zehnfach höhere Konzentration von Chloramin-T hatte eine deutlichere Wirkung (siehe Abb. 3.3 A, oben rechts). So wurde infolge der Applikation von $100 \mu\text{M}$ ChT das Integral signifikant um $43,5 \pm 8,0 \%$ erhöht ($p = 0,0001$), die Abfallzeit um $51,8 \pm 11,1 \%$ ($p = 0,0008$) und die Anstiegszeit um $23,1 \pm 8,3 \%$ ($p = 0,049$). Die Amplitude wurde geringfügig reduziert ($< 2,5 \pm 1,0 \text{ mV}$; $p = 0,044$).

In $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen war die Wirkung derselben Konzentrationen von Chloramin-T deutlich geringer, wie die untere Reihe von Abbildungen in Abbildung 3.3 A verdeutlicht. Infolge der Applikation von $10 \mu\text{M}$ ChT vergrößerte sich das Integral um $4,7 \pm 1,7 \%$

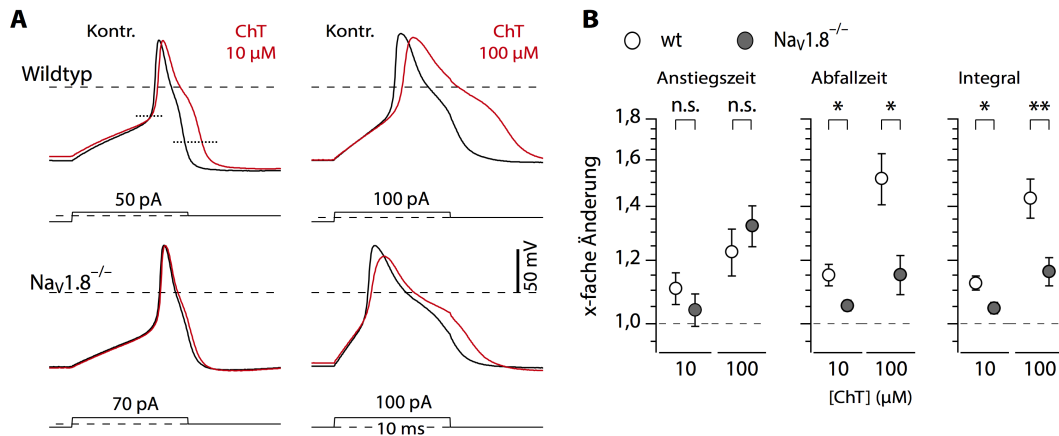


Abbildung 3.3.: Wirkung von Chloramin-T auf stimulierte Aktionspotenziale. A) Repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp- (oben) und Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (unten) vor der Behandlung (schwarz) mit 10 μM ChT (links) oder 100 μM (rechts) und nach der Behandlung (rot). **B)** Relative Änderungen der Anstiegszeit, Abfallzeit und des Integrals von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen (weiß) und Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (grau) 150 s nach Beginn der Behandlung ($n = 12$ bis 14).

($p = 0,014$) und die Abfallzeit um $5,4 \pm 1,6 \%$ ($p = 0,005$), wohingegen sich die Anstiegszeit nicht änderte ($p = 0,14$) und auch die Amplitude konstant blieb ($p = 0,10$). Die höhere ChT-Konzentration von 100 μM führte zu einer Vergrößerung des Integrals um $16,1 \pm 4,7 \%$ ($p = 0,005$) beziehungsweise der Abfallzeit um $15,2 \pm 6,5 \%$ ($p = 0,04$) und auch zu einer signifikanten Vergrößerung der Anstiegszeit um $32,6 \pm 7,8 \%$ ($p = 0,001$). Die Aktionspotenzialamplitude reduzierte sich um 8,2 mV ($p = 0,0001$).

Unabhängige Student'sche t-Tests ergaben, dass die Änderung des Integrals und der Abfallzeit der Aktionspotenziale infolge der ChT-Behandlung in Wildtyp-Neuronen signifikant größer ist als in Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (siehe Abb. 3.3 B). Die Änderung der Anstiegszeit unterschied sich hingegen nicht signifikant zwischen beiden Neuronentypen.

Blaulicht niedriger Strahlungsleistung hatte ähnlich wie Chloramin-T eine verbreiternde Wirkung auf Aktionspotenziale von Neuronen von Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 3.4 A, oben links) und vergrößerte das Integral um $7,8 \pm 1,1 \%$ ($p = 0,0001$) und die Abfallzeit um $6,6 \pm 1,6 \%$ ($p = 0,002$; siehe Abb. 3.4 B). Außerdem verlängerte sich die Anstiegszeit des Aktionspotenzials um $5,0 \pm 1,9 \%$ ($p = 0,04$). Die Bestrahlung mit blauem Licht hoher Strahlungsleistung führte zu einer entsprechend markanteren Veränderung des Integrals ($36,4 \pm 7,8 \%$; $p = 0,001$) und der Abfallzeit ($43,8 \pm 7,8 \%$; $p = 0,001$). Die Anstiegszeit wurde nicht signifikant geändert ($p = 0,18$). Unabhängig von der Strahlungsleistung trat keine Veränderung der Aktionspotenzialamplitude auf ($p > 0,2$).

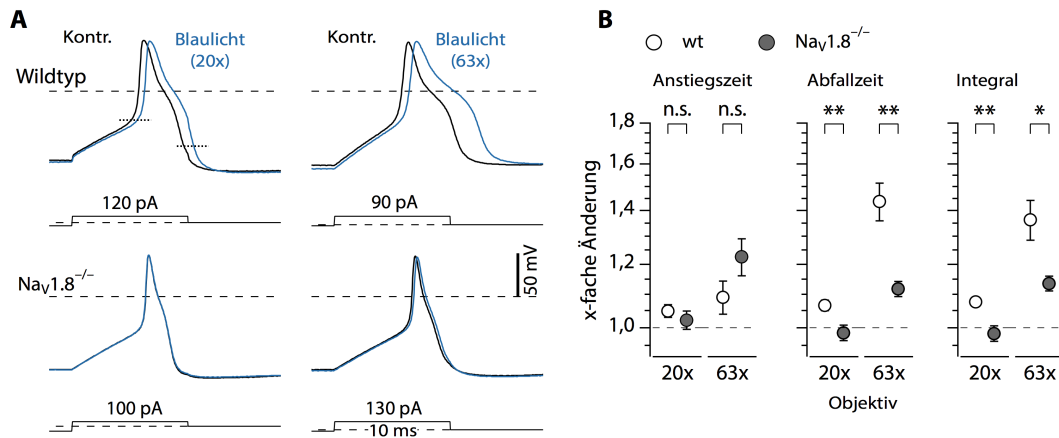


Abbildung 3.4.: Wirkung von Blaulicht auf stimulierte Aktionspotenziale. A) Repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp- (oben) und Nav1.8^{-/-}-Neuronen (unten) vor der Behandlung (schwarz) mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung (20x Objektiv, links) oder hoher Strahlungsleistung (63x Objektiv, rechts) und nach der Behandlung (blau). **B)** Relative Änderungen der Anstiegszeit, Abfallzeit und des Integrals von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen (weiß) und Nav1.8^{-/-}-Neuronen (grau) 150 s nach Beginn der Behandlung ($n = 12$ bis 14).

Blaulicht niedriger Strahlungsleistung hatte deutlich weniger Auswirkungen auf Aktionspotenziale von Nav1.8^{-/-}-Neuronen im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen (siehe Abb. 3.4 A, unten links). Keiner der bisher betrachteten Parameter änderte sich, was abermals einen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Neuronen bedeutete (Abb. 3.4 B).

Blaues Licht hoher Strahlungsleistung führte in Nav1.8^{-/-}-Neuronen zu einer signifikanten Vergrößerung des Integrals der Aktionspotenziale um $13,6 \pm 2,4\%$ ($p = 0,002$) und der Abfallzeit um $11,8 \pm 2,4\%$ ($p = 0,004$). Dieser Anstieg war in beiden Fällen signifikant geringer als der Anstieg des Aktionspotenzialintegrals von Wildtyp-Neuronen. Die Anstiegszeit der Aktionspotenziale vergrößerte sich um $22,6 \pm 6,5\%$; ($p = 0,003$), was sich nicht signifikant von der Änderung des Anstiegs von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen unterschied (Abb. 3.4 B). Die Aktionspotenzialamplitude blieb im Durchschnitt unverändert ($p > 0,05$).

Im direkten Vergleich über Student'sche t-Tests war klar erkennbar, dass beide verwendeten Strahlungsleistungen einen deutlich größeren Effekt auf Wildtyp-Aktionspotenziale hatten, als auf Neuronen, in denen Nav1.8 funktionell inaktiviert war (Abb. 3.4 A und B).

3.2.3. Die Wirkung von H_2O_2 auf stimulierte Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen

Um die beobachtete Wirkung von Chloramin-T und blauem Licht mit einem weiteren physiologischen Oxidationsmittel zu vergleichen, wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eingesetzt. Wasserstoffperoxid oxidiert spezifisch Cystein- und Methioninreste unabhängig vom Grad ihrer Exponiertheit innerhalb des Proteins (Keck, 1996). Es wurde entsprechend die Beeinflussung von stimulierten Aktionspotenzialen bei Behandlung mit moderaten Konzentrationen von H_2O_2 , beziehungsweise des hydrophoberen Derivats *tert*-Butyl-Hydroperoxid untersucht.

Sowohl Wasserstoffperoxid als auch tBHP in einer Konzentration von 100 μM bewirkten eine Verlängerung stimulierter Aktionspotenziale, allerdings in geringerem Umfang als Chloramin-T. Wie in Abbildung 3.5 B zu sehen, erhöhte H_2O_2 im Unterschied zu ChT und Blaulicht die Anstiegszeit signifikant um $6,3 \pm 2,6 \%$ ($p = 0,001$) und die Abfallzeit um $7,2 \pm 3,0 \%$ ($p = 0,047$). Das Integral blieb trotz gleichbleibender Aktionspotenzialamplitude (nicht gezeigt) allerdings unverändert ($p = 0,11$). Das oxidativ auf Cystein- und Methioninreste auf der Proteinoberfläche beschränkte tBHP hatte keine signifikante Wirkung auf die Anstiegszeit, erhöhte allerdings die Abfallzeit um $10,4 \pm 2,6 \%$ ($p = 0,002$) und das Aktionspotenzialintegral um $4,5 \pm 2,1 \%$ ($p = 0,043$).

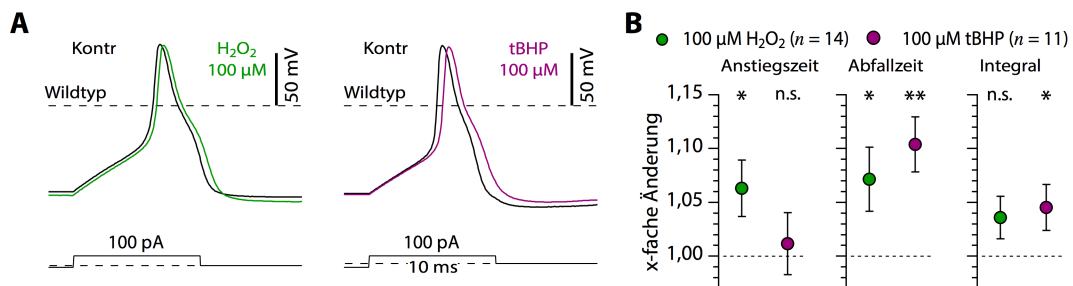


Abbildung 3.5.: Einfluss von H_2O_2 und tBHP auf stimulierte Aktionspotenziale. A) Repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen vor der Behandlung (schwarz) und nach der Behandlung mit 100 μM H_2O_2 (links, grün) oder 100 μM tBHP (rechts, lila). B) Relative Änderung der Anstiegszeit, Abfallzeit und des Integrals von Wildtyp-Neuronen 150 s nach Beginn der Applikation von H_2O_2 (grün) oder tBHP (lila). Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

3.2.4. Reaktive Spezies ändern stimulierte Aktionspotenziale auch in Gegenwart von Tetrodotoxin

Mit Hilfe von Tetrodotoxin sollte untersucht werden, ob die funktionelle Inhibition TTX-sensitiver spannungsgesteuerter Natriumkanäle von Wildtyp-DRG-Neuronen die Wirkung reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale vergrößert. In Gegenwart von 300 nM TTX in der Badlösung wurden sämtliche TTX-sensitive Natriumkanäle von einer Beteiligung an Aktionspotenzialen ausgeschlossen.

Die Neuronen waren auch in Gegenwart von 300 nM TTX weiterhin in der Lage, Aktionspotenziale zu feuern. Hinsichtlich einiger Parameter unterschied sich jedoch die unter TTX-Einfluss gemessenen Aktionspotenziale (insgesamt $n = 21$) von den ohne TTX aufgenommenen Aktionspotenzialen ($n = 48$; Abb. 3.6 A, vgl. mit Abb. 3.2). So war vor Beginn der Messungen die Anstiegszeit in Gegenwart von TTX mit $2,31 \pm 0,08$ ms größer als ohne TTX ($1,34 \pm 0,09$ ms; $p = 1 \cdot 10^{-10}$), ebenso wie die Abfallzeit (mit TTX: $4,60 \pm 0,30$ ms; ohne TTX: $3,60 \pm 0,02$ ms; $p = 0,0045$). Dementsprechend war auch das Integral unter Einfluss von TTX im Durchschnitt größer (mit TTX: $393,6 \pm 19,9 \mu\text{V s}^{-1}$; ohne TTX: $306,0 \pm 12,7 \mu\text{V s}^{-1}$; $p = 0,0007$). Außerdem erreichte die Hyperpolarisationsphase unter Einwirkung von TTX weniger negative Spannungen als ohne TTX (mit TTX: $-75,3 \pm 1,6$ mV; ohne TTX: $-87,5 \pm 1,0$ mV; $p = 1 \cdot 10^{-7}$). Die Aktionspotenzialamplitude unterschied sich hingegen nicht (mit TTX: $134,2 \pm 1,3$ mV; ohne TTX: $136,2 \pm 1,0$ mV; $p = 0,26$). Ein weiterer signifikanter Unterschied betraf die Spannungsschwelle der Aktionspotenziale, die unter Einwirkung von TTX mit $-19,8 \pm 1,1$ mV um durchschnittlich 12,6 mV positiver war als die von Aktionspotenzialen in Abwesenheit von TTX ($p = 1 \cdot 10^{-10}$).

In Gegenwart von TTX zeigte sich eine verminderte Wirkung sowohl von blauem Licht als auch von Chloramin-T (Abb. 3.6 B) auf Aktionspotenziale. Während Blaublicht überhaupt keine statistisch signifikanten Veränderungen erwirkte, erhöhte Chloramin-T die Abfallzeit um $11,7 \pm 3,3$ % ($p = 0,01$) und das Integral um $6,3 \pm 2,5$ % ($p = 0,04$; Abb. 3.6 C). Auffällig war die infolge der ChT-Behandlung unveränderte Anstiegszeit von Aktionspotenzialen in Gegenwart von TTX. Diese Änderung der Anstiegszeit unterschied sich signifikant von der Wirkung von Chloramin-T auf Aktionspotenziale in Abwesenheit von TTX ($p = 0,03$).

3.2. Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen

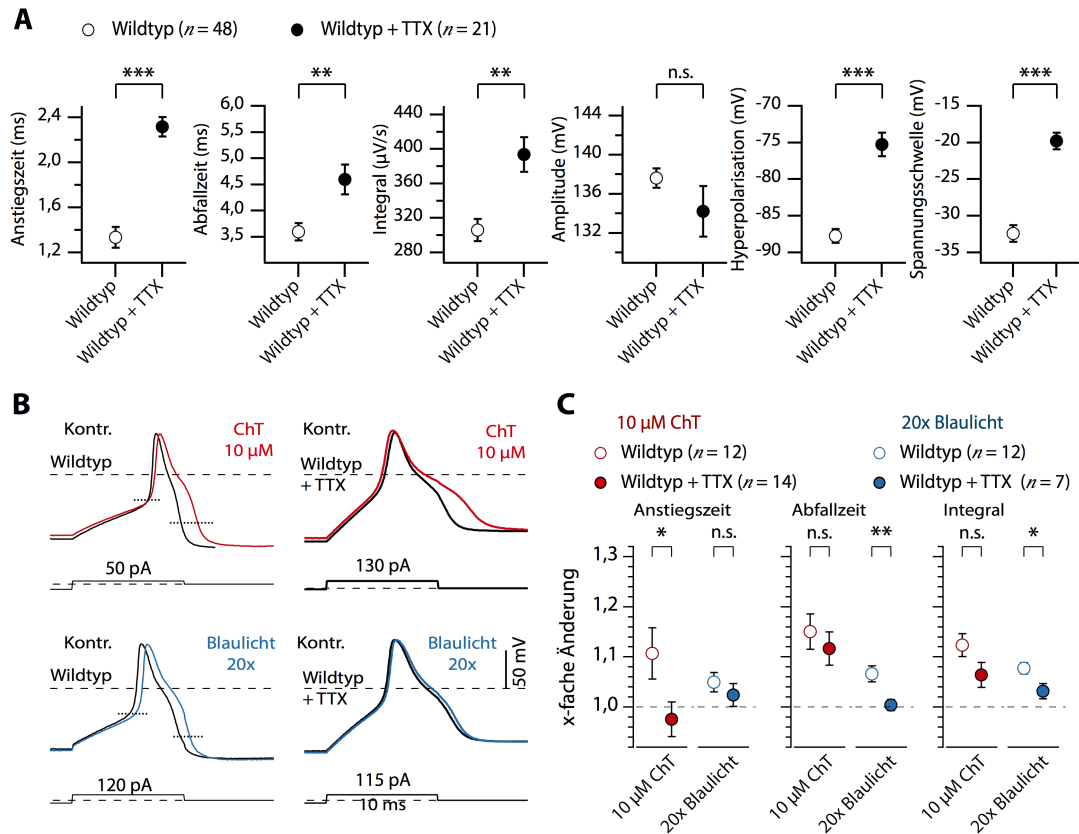


Abbildung 3.6.: Einfluss von ChT und Blaulicht auf stimulierte Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen in Gegenwart von TTX. A) Vergleich von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen ohne TTX (leere Kreise) und mit 300 nM TTX in der Badlösung (schwarz gefüllte Kreise) hinsichtlich Anstiegszeit, Abfallzeit, Integral, Aktionspotenzialamplitude, minimaler Spannung während der Hyperpolarisation und Spannungsschwelle. **B)** Repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen ohne TTX in der Badlösung (links) und mit 300 nM TTX in der Badlösung (rechts) vor der Erzeugung reaktiver Spezies (schwarz) und nach Badaustausch mit 10 μM ChT-haltiger Badlösung (rot, oben) beziehungsweise der Bestrahlung mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung (blau, unten). **C)** Relative Änderung der Anstiegszeit, Abfallzeit und des Integrals von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen ohne TTX (offene Kreise) und mit TTX (gefüllte Kreise) 150 s nach Beginn der Erzeugung reaktiver Spezies. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

3.2.5. Aktionspotenziale von MSRA^{-/-}-Neuronen werden durch reaktive Spezies anders als Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen geändert

MSRA^{-/-}-Mäuse wurden als Altersmodellssystem mit gestörter Methionin-Methionin-sulfoxid-Homöostase untersucht (Stadtman *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang soll-

te geprüft werden, welche Auswirkungen reaktive Spezies bei potenziell bereits vorhandenen oxidativen Modifikationen haben. Die verwendeten Mäuse waren alle über 50 Wochen alt, die Wildtyp-Mäuse zum Vergleich zwischen 15 bis 45 Wochen. Aktionspotenziale von MSRA^{-/-}-Neuronen ($n = 18$) unterschieden sich von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen (Abb. 3.7 A).

Die Abfallzeit der Aktionspotenziale war erhöht (MSRA^{-/-}: $5,21 \pm 0,30$ ms; Wildtyp: $3,59 \pm 0,16$ ms; $p = 6 \cdot 10^{-5}$). Entsprechend war auch das Integral der Aktionspotenziale von MSRA^{-/-}-Neuronen erhöht (MSRA^{-/-}: $422,2 \pm 23,3 \mu\text{V s}^{-1}$ gegenüber Wildtyp: $306,0 \pm 12,7 \mu\text{V s}^{-1}$; $p = 0,0002$). Die Hyperpolarisationsspannung unterschied sich geringfügig und war in Aktionspotenzialen von MSRA^{-/-}-Neuronen im Schnitt positiver (MSRA^{-/-}: $-84,1 \pm 1,1$ mV gegenüber Wildtyp: $-87,7 \pm 1,0$ mV; $p = 0,023$). Sowohl die Aktionspotenzialamplitude als auch die Spannungsschwelle waren hingegen nicht geändert.

In MSRA^{-/-}-Neuronen erhöhte Chloramin-T einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ die Abfallzeit der Aktionspotenziale um $7,8 \pm 1,4 \%$ ($p = 0,0006$) und das Aktionspotenzialintegral um $6,4 \pm 1,2 \%$ ($p = 0,0009$; siehe Abb. 3.7 B). Die Anstiegszeit erhöhte sich signifikant um $17,6 \pm 4,5 \%$ ($p = 0,006$).

Blaulicht niedriger Strahlungsleistung erhöhte die Abfallzeit um $12,8 \pm 1,6 \%$ ($p = 0,002$) und das Integral um $11,1 \pm 2,4 \%$ ($p = 0,004$). Die Anstiegszeit steigerte sich zwar signifikant, aber nur um $3,0 \pm 1,2 \%$ ($p = 0,04$).

3.2.6. Ascorbinsäure reduziert die Wirkung blauen Lichts auf Aktionspotenziale und ändert die Wirkung von Chloramin-T

Das wiederholte Auslösen einzelner Aktionspotenziale war in Gegenwart von intrazellulärem DTT nicht möglich. Neben Schwankungen des Ruhepotenzials war der Strom zur Stimulation einzelner Aktionspotenziale innerhalb kurzer Zeit nicht mehr ausreichend, um Aktionspotenziale auszulösen. Dies könnte darin begründet sein, dass das starke Reduktionsmittel DTT das Redox-Gleichgewicht der Zelle stark stört, was einige der an Aktionspotenzialen beteiligten Ionenkanalfamilien möglicherweise in ihrer Funktion beeinträchtigt.

Deshalb wurde Ascorbinsäure als physiologischer Radikalfänger eingesetzt. Ascorbinsäure ist ein endogenes Antioxidationsmittel, das in millimolaren Konzentrationen innerhalb der Zelle vorkommt und damit ein wichtiger Bestandteil des zellulären Redoxmilieus ist (Hediger, 2002).

3.2. Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen

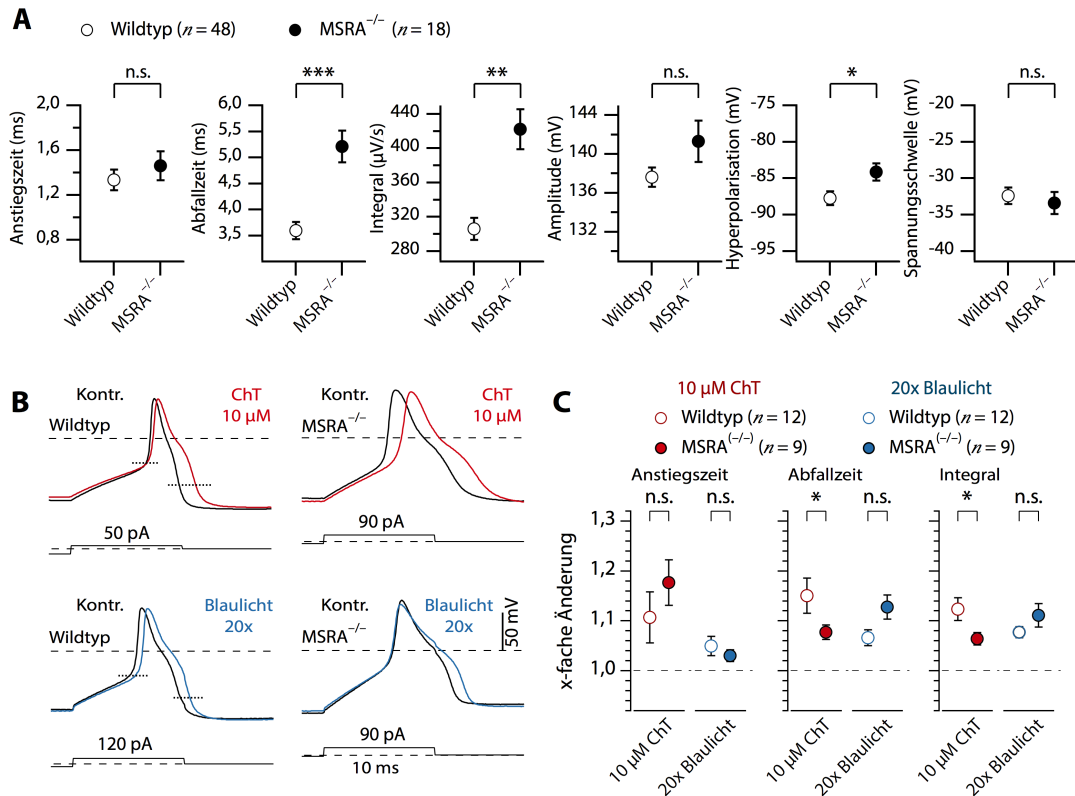


Abbildung 3.7.: Einfluss von ChT und Blaulicht auf stimulierte Aktionspotenziale von MSRA^{-/-}-Neuronen. **A**) Vergleich von Wildtyp- (leere Kreise) und MSRA^{-/-}-Neuronen (schwarz gefüllte Kreise) hinsichtlich Anstiegszeit, Abfallzeit, Integral, Aktionspotenzialamplitude, minimaler Spannung während der Hyperpolarisation und Spannungsschwelle. **B**) Repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen (links) und MSRA^{-/-}-Neuronen (rechts) vor der Erzeugung reaktiver Spezies (schwarz) und nach Badaustausch mit 10 μM ChT-haltiger Badlösung (rot, oben) beziehungsweise der Bestrahlung mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung (blau, unten). **C**) Relative Änderung der Anstiegszeit, Abfallzeit und des Integrals von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen (offene Kreise) und MSRA^{-/-}-Neuronen (gefüllte Kreise) 150 s nach Beginn der Erzeugung reaktiver Spezies. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

Intrazelluläre Ascorbinsäure in einer Konzentration von 3 mM führte zu Unterschieden von Aktionspotenzialen im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen ohne intrazelluläre Ascorbinsäure (mit Ascorbinsäure: $n = 24$; siehe Abb. 3.8 A). Die Abfallzeit war erhöht (mit Ascorbinsäure: $5,03 \pm 0,24$ ms; ohne Ascorbinsäure: $3,59 \pm 0,16$ ms; $p = 1 \cdot 10^{-5}$) und dementsprechend auch das Integral (mit Ascorbinsäure: $394,6 \pm 19,9 \mu\text{V s}^{-1}$; ohne Ascorbinsäure: $306,0 \pm 12,7 \mu\text{V s}^{-1}$; $p = 0,0001$). Während die Aktionspotenzialamplitude und die Spannungsschwelle unverändert blieben, wurde die Spannung der Hyperpolarisation wesentlich positiver (mit Ascorbinsäure: $-72,6 \pm 1,1$ mV; ohne Ascorbinsäure:

3.2. Reaktive Spezies verbreitern stimulierte einzelne Aktionspotenziale von Wildtyp-DRG-Neuronen

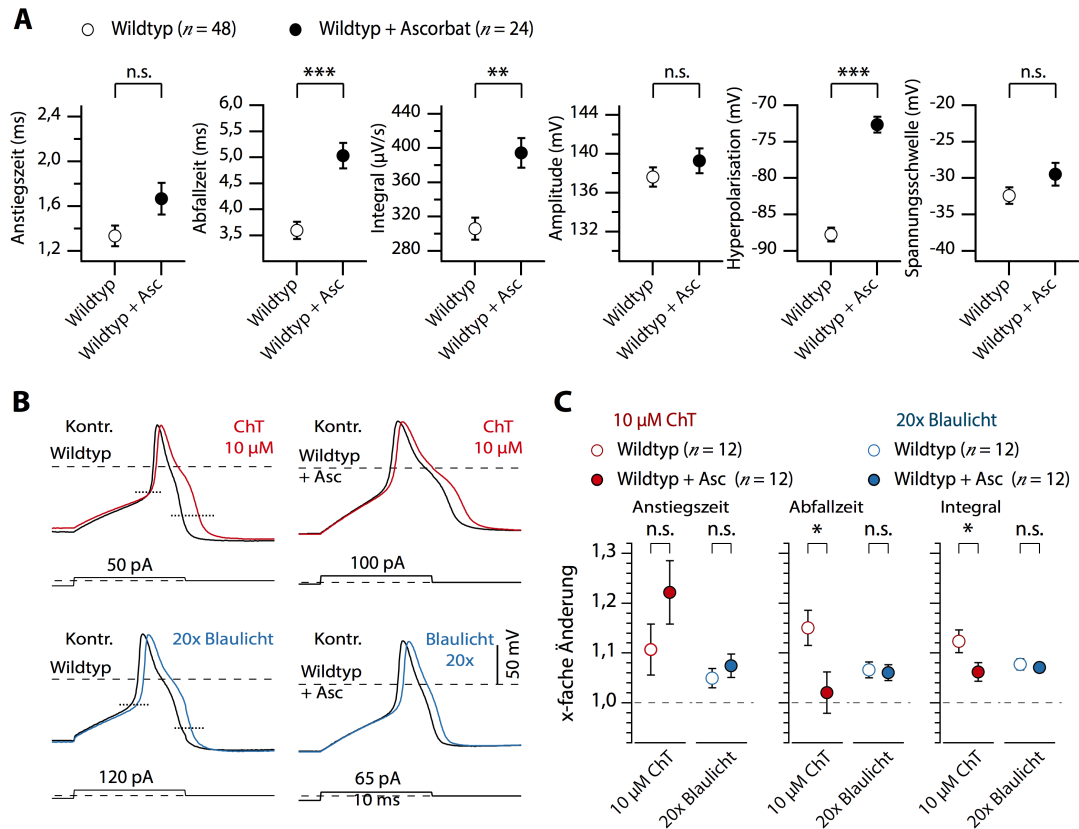


Abbildung 3.8.: Wirkung reaktiver Spezies auf stimulierte Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen mit Ascorbinsäure in der Intrazellulärlösung. A) Vergleich von Wildtyp-Neuronen ohne intrazelluläre Ascorbinsäure (leere Kreise) und mit intrazellulärer Ascorbinsäure (schwarz gefüllte Kreise) hinsichtlich Anstiegszeit, Abfallzeit, Integral, Aktionspotenzialamplitude, minimaler Spannung während der Hyperpolarisation und Spannungsschwelle. **B)** Repräsentative Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen ohne intrazellulärer Ascorbinsäure (links) und mit 3 mM Ascorbinsäure in der Intrazellulärlösung (rechts) vor der Erzeugung reaktiver Spezies (schwarz) und nach Badaustausch mit 10 μM ChT-haltiger Badlösung (rot, oben) beziehungsweise der Bestrahlung mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung (blau, unten). **C)** Relative Änderung der Anstiegszeit, Abfallzeit und des Integrals von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen ohne Ascorbinsäure (offene Kreise) und von Wildtyp-Neuronen mit 3 mM intrazellulärer Ascorbinsäure (gefüllte Kreise) 150 s nach Beginn der Erzeugung reaktiver Spezies. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben.

$-87,5 \pm 1,0$ mV; $p = 1 \cdot 10^{-14}$).

Der Anstieg des Aktionspotenzialintegrals und der Abfallzeit infolge der Applikation von 10 μM ChT wurde im Vergleich zu Zellen ohne intrazelluläre Ascorbinsäure signifikant reduziert ($p = 0,049$ beziehungsweise $p = 0,027$; siehe Abb. 3.8 B). Das Integral stieg in Gegenwart von Ascorbinsäure lediglich um $6,8 \pm 1,8$ % ($p = 0,01$), während die

Abfallzeit nicht mehr geändert wurde ($p = 0,69$). Die Anstiegszeit des Aktionspotentials erhöhte sich um $22,2 \pm 6,3 \%$ ($p = 0,001$).

Die Effekte blauen Lichts niedriger Strahlungsleistung wurden durch intrazelluläre Ascorbinsäure nicht signifikant geändert.

3.3. Reaktive Spezies vermindern Maximalstrom und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle von DRG-Neuronen

Die unterschiedlichen Auswirkungen der gleichen reaktiven Spezies auf stimulierte Aktionspotenziale von Wildtyp und $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen deuteten auf eine besondere Rolle des spannungsgesteuerten Natriumkanals $\text{Na}_V1.8$ hinsichtlich der Vermittlung der beobachteten Stressantwort hin.

Deshalb wurden $\text{Na}_V1.8$ -Ströme von $\text{Na}_V1.9^{-/-}$ -Neuronen mit Hilfe der Spannungsklemme untersucht. TTX-sensitive Ströme wurden mit 300 nM TTX wirksam unterdrückt. Zum Vergleich wurden in einer zweiten Messreihe TTX-s-Ströme von $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen untersucht. Neuronen mit signifikantem Anteil nicht-blockierbaren $\text{Na}_V1.9$ -Stroms wurden verworfen. Als stabiler und leicht zu erfassender Parameter zur Bewertung von Änderungen der jeweiligen Kanaleigenschaften wurde der Maximalstrom herangezogen, der infolge von gezielten Spannungssprüngen auf wenig negative beziehungsweise positive Spannungen innerhalb weniger Millisekunden erreicht ist. Außerdem wurde das Stromintegral, vom Zeitpunkt des Maximalstroms bis zum Ende des jeweiligen Testpotenzials, im Verhältnis zu einem hypothetischen Stromverlauf ohne Inaktivierung angegeben. Auf diese Weise wurde ein um eventuelle Maximalstromänderungen bereinigter Inaktivierungsparameter R_i erhalten (siehe Abschnitt 2.5.3), dessen Wert zwischen 0 und 1 liegt. Ist der Wert von R_i nahe 0, repräsentiert dies eine sehr schnelle Inaktivierung. Ein R_i -Wert von 1 bedeutet die völlige Abwesenheit von Inaktivierung.

3.3.1. Die Wirkung von Chloramin-T auf $\text{Na}_V1.8$ - und TTX-s-Ströme

Chloramin-T in der Konzentration von 10 μM führte zu einer Reduktion des Maximalstroms von $\text{Na}_V1.8$ um $25,6 \pm 3,1 \%$ ($p = 2 \cdot 10^{-5}$) bei -26 mV und $17,4 \pm 2,7 \%$ bei $+4 \text{ mV}$ ($p = 2 \cdot 10^{-5}$; Abb. 3.9 B). Im Falle der TTX-s-Ströme trat keine signifikante Reduktion des Maximalstroms ein ($p > 0,4$), was einem hochsignifikanten Unterschied zu $\text{Na}_V1.8$ sowohl bei -26 mV ($p = 4 \cdot 10^{-7}$) als auch bei $+4 \text{ mV}$ ($p = 4 \cdot 10^{-5}$) entsprach.

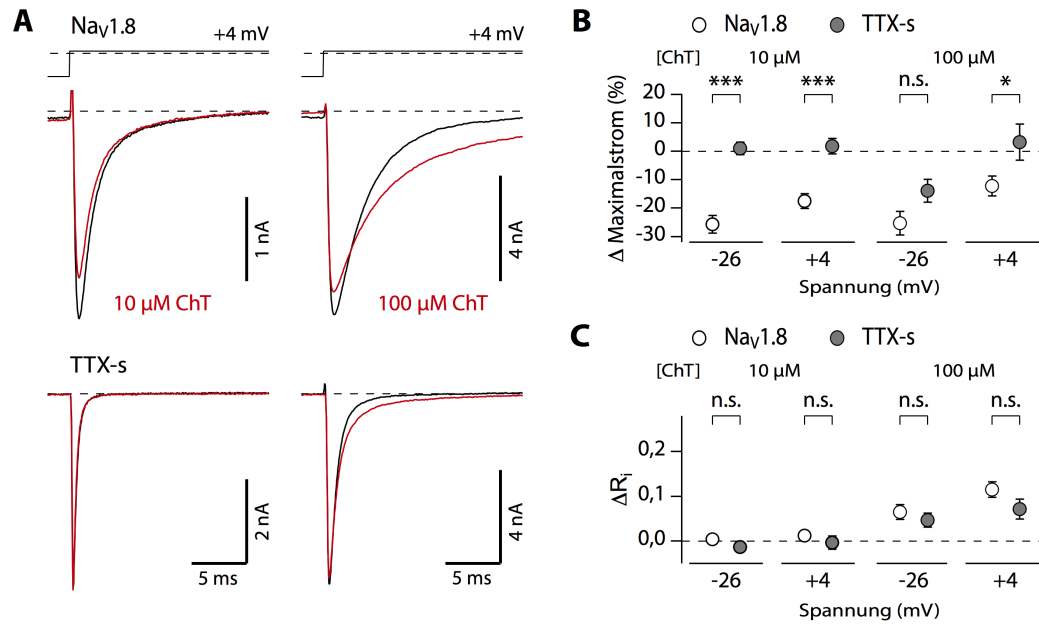


Abbildung 3.9.: Wirkung von Chloramin-T auf Na_V1.8- und TTX-s-Ströme. **A)** Repräsentative Na_V1.8-Stromspuren von Na_V1.9^{-/-}-Neuronen (oben), beziehungsweise TTX-s-Stromspuren von Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (unten), vor der Behandlung (schwarz) mit 10 μM ChT (links) oder 100 μM (rechts) und nach der Behandlung (rot). **B)** Prozentuale Änderung des Maximalstroms (**B**) und Änderung des Inaktivierungsindex (**C**) bei Testspannungen von -26 mV und +4 mV 150 s nach Beginn der ChT-Applikation ($n = 12$ bis 15).

(Abb. 3.9 B). Die Inaktivierung wurde hingegen im selben Zeitraum weder bei Na_V1.8 noch bei TTX-s-Strömen signifikant geändert ($p > 0,09$; Abb. 3.9 C). Dementsprechend unterschied sich die relative Änderung auch nicht signifikant zwischen den Neuronentypen ($p > 0,1$).

Die zehnfach höhere Konzentration von ChT führte im Vergleich zu 10 μM ChT zu einer geringeren Reduktion des Maximalstroms von Na_V1.8, um $25,2 \pm 4,2 \%$ ($p = 0,0003$) bei -26 mV und um $12,2 \pm 3,5 \%$ bei +4 mV ($p = 0,005$). TTX-s-Ströme wurden durch die Wirkung von 100 μM ChT nur bei einer Testspannung von -26 mV signifikant reduziert, um $-13,5 \pm 3,8 \%$ ($p = 0,0003$). Diese Reduktion war allerdings signifikant geringer als die Reduktion des Na_V1.8-Maximalstroms ($p = 0,046$). Bei +4 mV trat bei TTX-s-Strömen keine Änderung auf ($p = 0,78$), was einem signifikanten Unterschied zur Änderung des Na_V1.8-Maximalstroms entsprach ($p = 0,41$; Abb. 3.9 B). Eine Spannungsabhängigkeit war feststellbar; die Wirkung von Chloramin-T auf den Maximalstrom von Na_V1.8 war bei -26 mV größer.

Infolge der Applikation von 100 μM ChT wurde die Inaktivierung von TTX-s-Strömen signifikant verlangsamt, bei -26 mV von $R_i = 0,20 \pm 0,02$ auf $R_i = 0,25 \pm 0,02$

($p = 0,009$) und bei +4 mV von $R_i = 0,05 \pm 0,02$ auf $R_i = 0,12 \pm 0,03$ ($p = 0,008$). Die Verlangsamung der Inaktivierung bei $\text{Na}_V1.8$ -Strömen war hingegen sowohl absolut größer als auch signifikanter, von $R_i = 0,37 \pm 0,03$ auf $R_i = 0,43 \pm 0,02$ ($p = 0,002$) bei -26 mV und von $R_i = 0,16 \pm 0,01$ auf $R_i = 0,27 \pm 0,02$ ($p = 1 \cdot 10^{-5}$) bei +4 mV (Abb. 3.9 C). Wiederum zeigte sich eine Spannungsabhängigkeit; die Verlangsamung der Inaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ war bei der positiveren Spannung größer. In Abbildung 3.9 C wird außerdem deutlich, dass die Verlangsamung der Inaktivierung zwischen $\text{Na}_V1.8$ -Strömen und TTX-s-Strömen nicht verschieden war ($p > 0,13$).

3.3.2. Die Wirkung von blauem Licht auf $\text{Na}_V1.8$ - und TTX-s-Ströme

Blaues Licht niedriger Strahlungsleistung führte bei $\text{Na}_V1.8$ zu keiner merklichen Veränderung des Maximalstroms ($p > 0,07$). Auch bei TTX-s-Kanälen verringerte sich der Maximalstrom signifikant nur bei -26 mV um $4,6 \pm 1,6 \%$ ($p = 0,007$). Folglich gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Natriumkanälen bei beiden Testspannungen ($p > 0,06$; Abb. 3.10 B).

Die auftretende Verlangsamung der Inaktivierung $\text{Na}_V1.8$ -vermittelter Ströme war allerdings größer im Vergleich zu ChT (vgl. Abb. 3.9 C). Bereits unter der Wirkung blauen Lichts niedriger Strahlungsleistung vergrößerte sich der Inaktivierungsindex bei -26 mV von $R_i = 0,35 \pm 0,02$ auf $R_i = 0,41 \pm 0,04$ ($p = 0,0011$) und bei +4 mV von $R_i = 0,14 \pm 0,01$ auf $R_i = 0,20 \pm 0,02$ ($p = 0,0004$), wohingegen sich der Inaktivierungsindex bei TTX-s-Kanälen bei einer Testspannung von -26 mV von $R_i = 0,098 \pm 0,005$ auf $R_i = 0,107 \pm 0,006$ ($p = 0,03$) beziehungsweise bei +4 mV von $R_i = 0,01 \pm 0,01$ auf $R_i = 0,03 \pm 0,01$ ($p = 0,0002$) erhöhte. Die Verlangsamung der Inaktivierung der $\text{Na}_V1.8$ -Kanäle war demzufolge signifikant stärker als die Verlangsamung der Inaktivierung von TTX-s-Kanälen bei beiden Testspannungen (-26 mV: $p = 0,004$; +4 mV: $p = 0,035$; Abb. 3.10 C).

Blaulicht hoher Strahlungsleistung verstärkte diesen Effekt nochmals deutlich, mit einer Verlangsamung der Inaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ bei -26 mV von $R_i = 0,35 \pm 0,03$ auf $R_i = 0,57 \pm 0,03$ ($p = 1 \cdot 10^{-12}$) beziehungsweise von $R_i = 0,13 \pm 0,02$ auf $R_i = 0,35 \pm 0,03$ ($p = 2 \cdot 10^{-10}$) bei +4 mV, was einen hochsignifikanten Unterschied gegenüber TTX-s-Strömen bedeutet sowohl bei -26 mV ($p = 4 \cdot 10^{-7}$) als auch bei +4 mV ($p = 7 \cdot 10^{-5}$; Abb. 3.10 C). Weiterhin wurde durch Bestrahlung mit blauem Licht hoher Strahlungsleistung der Maximalstrom von $\text{Na}_V1.8$ signifikant reduziert, um $23,5 \pm 4,2 \%$ (-26 mV: $p = 0,0003$) beziehungsweise um $13,5 \pm 4,0 \%$ (+4 mV: $p = 0,008$). Der Maximalstrom der TTX-s-Ströme wurde bei -26 mV um $20,5 \pm 3,6 \%$ reduziert ($p = 0,0003$),

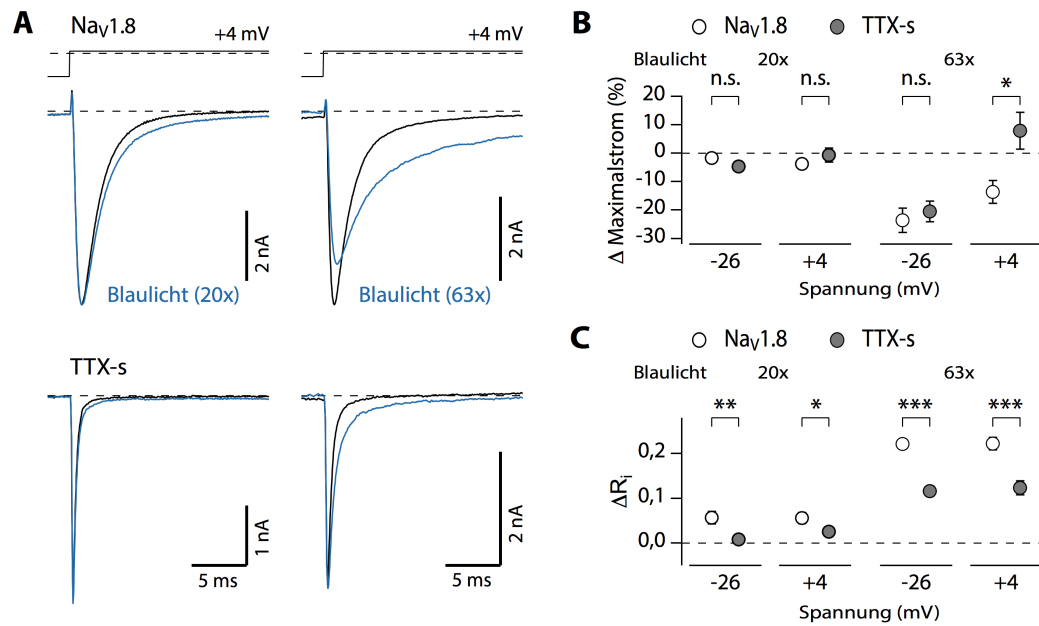


Abbildung 3.10.: Wirkung von Blau light auf Na_V1.8- und TTX-s-Ströme. **A)** Repräsentative Na_V1.8-Stromspuren von Na_V1.9^{-/-}-Neuronen (oben) beziehungsweise TTX-s-Stromspuren von Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (unten), vor der Bestrahlung (schwarz) mit Blau light niedriger Strahlungsleistung (20x, links) oder Blau light hoher Strahlungsleistung (63x, rechts) und nach der Bestrahlung (blau). **B)** Prozentuale Änderung des Maximalstroms (**B**) und Änderung des Inaktivierungsindex (**C**) bei Testpotenzialen von -26 mV und +4 mV nach 150 s Bestrahlungsdauer ($n = 12$ bis 15).

was diese Reduktion nicht signifikant verschieden von der Reduktion der Na_V1.8-Ströme machte ($p = 0,59$). Bei +4 mV stieg der Maximalstrom der TTX-s-Ströme um $7,8 \pm 6,5 \%$ an, was einen signifikanten Unterschied gegenüber der festgestellten Reduktion des Maximalstroms von Na_V1.8 bei dieser Spannung darstellt ($p = 0,011$).

3.3.3. Änderungen der Strom-Spannungsbeziehungen von Na_V1.8- und TTX-s-Kanälen durch reaktive Spezies

Vor Beginn jeder Messung wurde eine Strom-Spannungskurve aufgenommen. Viele untersuchte Neuronen verloren durch die kontinuierliche elektrophysiologische Messung und die Wirkung der erzeugten reaktiven Spezies innerhalb von etwa 500 s ihre Integrität, feststellbar unter anderem anhand zunehmend größer werdender Leckströme. Um einen möglichen Einfluss der oxidativen Behandlung auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu prüfen, wurde bei stabilen Neuronen etwa 600 s nach Beginn des Bad-

austauschs beziehungsweise der Bestrahlung eine zweite Strom-Spannungskurve aufgenommen.

Es zeigte sich, dass die halbmaximale Aktivierungsspannung von $\text{Na}_V1.8$ nach Behandlung mit reaktiven Spezies unverändert bleibt. Dagegen verschob sich die halbmaximale Aktivierungsspannung der TTX-s-Kanäle signifikant von $-55,0 \pm 0,4$ mV auf $-63,1 \pm 0,5$ mV durch die Wirkung von $100 \mu\text{M}$ Chloramin-T (Abb. 3.11 E) und von $53,4 \pm 0,7$ mV auf $55,9 \pm 0,5$ mV durch Bestrahlung mit Blaulicht hoher Strahlungsleistung (Abb. 3.11 J). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung war bei $\text{Na}_V1.8$ erhöht von $13,2 \pm 1,2$ mV auf $16,3 \pm 0,5$ mV.

Die TTX-s-Kanäle waren nach der zehnminütigen Wirkung reaktiver Spezies nicht weniger modifiziert als $\text{Na}_V1.8$ -Kanäle. Es konnte eine verminderte Stromantwort nach der Behandlung mit reaktiven Spezies sowohl von $\text{Na}_V1.8$ als auch von TTX-s-Kanälen festgestellt werden. Die relativen Stromamplituden über den gesamten Spannungsbereich nach der Wirkung von $100 \mu\text{M}$ ChT für betragen für $\text{Na}_V1.8$ -Kanäle durchschnittlich $0,75 \pm 0,03$ und für TTX-s-Kanäle $0,60 \pm 0,01$. Blaulicht hoher Strahlungsleistung verminderte die relative Amplitude von $\text{Na}_V1.8$ auf $0,63 \pm 0,05$ und die von TTX-s-Kanälen auf $0,70 \pm 0,02$.

3.3.4. Vergleich der Gleichgewichtsinaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ - und TTX-s-Kanälen

Mit dem unter Abschnitt 2.5.3 beschriebenen Protokoll wurde die Gleichgewichtsinaktivierung untersucht. Mit den ermittelten Werten kann man Aussagen über die Kanalverfügbarkeit in Abhängigkeit des Haltepotenzials treffen. Damit lässt sich unter anderem der relative Anteil der Kanäle an Aktionspotenzialen einschätzen.

Es zeigte sich, dass $\text{Na}_V1.8$ -Ströme halbmaximal bei $-55,2 \pm 1,2$ mV inaktiviert wurden, TTX-s-Ströme jedoch bereits bei $-94,9 \pm 1,1$ mV (Abb. 3.12 B und C, links). Die ermittelten Werte sind abhängig von der spezifischen Zusammensetzung der Intrazellulärlösung. Dennoch kann gefolgert werden, dass auch mit dem für stimulierte Aktionspotenziale sehr negativen Haltepotenzial von -83 mV der Großteil der TTX-s-Kanäle in einem inaktivierten Zustand vorliegt, während $\text{Na}_V1.8$ -Kanäle voll aktivierbar sein sollten.

Hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung gab es geringe Unterschiede zwischen beiden Strömen (k_h für $\text{Na}_V1.8 = 5,3 \pm 0,2$ mV; k_h für TTX-s = $6,4 \pm 0,2$ mV; $p = 0,004$; Abb. 3.12 C, rechts).

Das entsprechende Spannungsprotokoll setzte die Neuronen aufgrund der 500 ms-anliegenden, immer positiver werdenden Spannungen unter erheblichen Stress. Aus die-

3.3. Reaktive Spezies vermindern Maximalstrom und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle von DRG-Neuronen

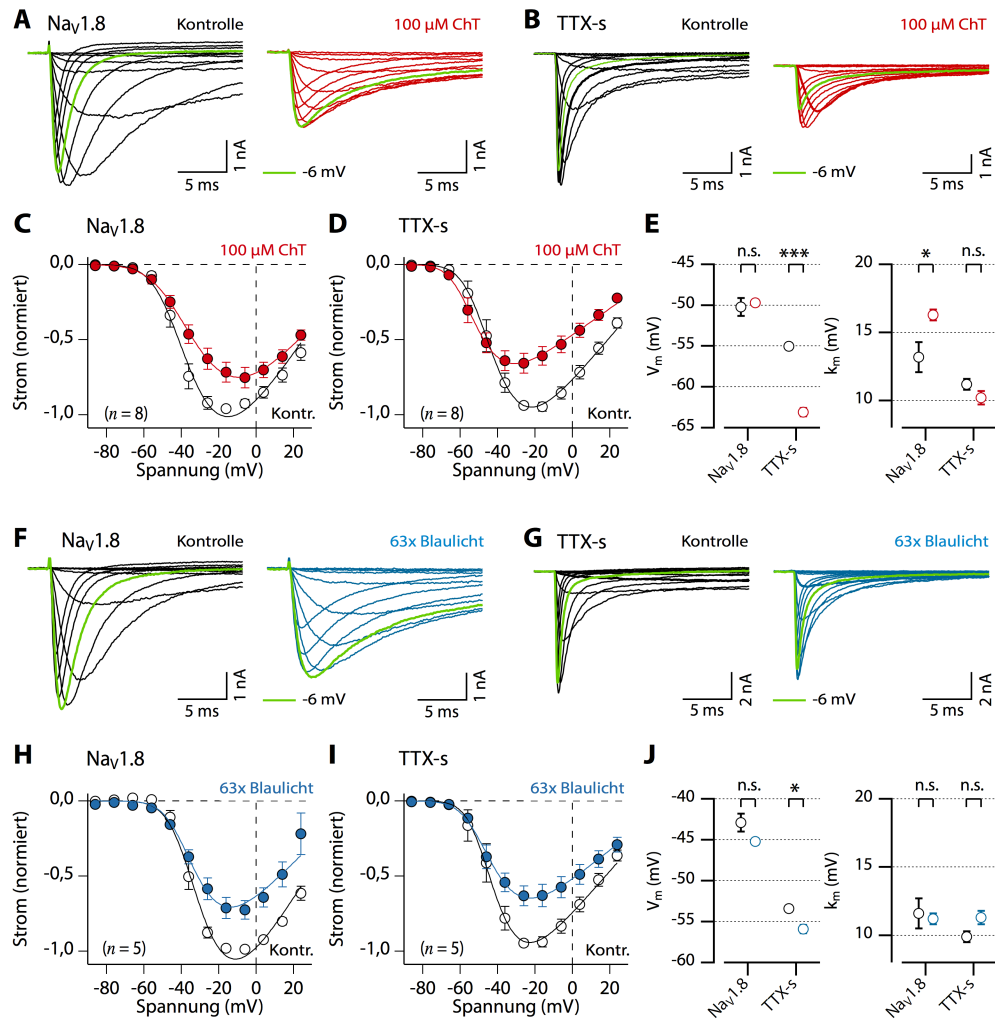


Abbildung 3.11.: Strom-Spannungsbeziehungen vor und nach Behandlung mit 100 μM ChT oder Blaulicht hoher Strahlungsleistung. Repräsentative Stromantworten von Na_v1.8 (A, F) und TTX-s (B, G) auf Depolarisationen ausgehend von –126 mV auf –86 mV bis +24 mV in 10 mV-Schritten vor (schwarz) und nach der Behandlung mit reaktiven Spezies (farbig). Die Stromantwort auf eine Testspannung von –6 mV ist grün markiert. Normierte, durchschnittliche Stromantwort von Na_v1.8-Strömen von Na_v1.9^{–/–}-Neuronen (C, H) und TTX-s-Strömen von Na_v1.8^{–/–}-Neuronen (D, I) auf genannte Depolarisationen, vor der Behandlung (schwarz) und 600 s nach der Behandlung mit reaktiven Spezies (farbig). E, J) Halbmaximale Aktivierungsspannung V_m (links) und Spannungsabhängigkeit der Aktivierung k_m (rechts) vor (schwarz) und 600 s nach Beginn der Behandlung mit reaktiven Spezies (farbig).

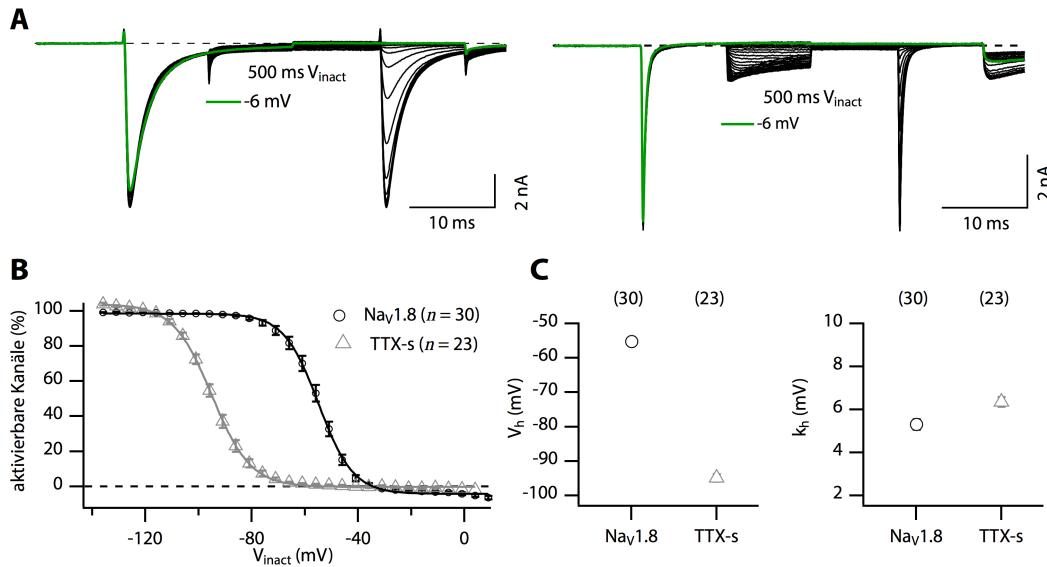


Abbildung 3.12.: Gleichgewichtsinaktivierung von $Na_V1.8$ - und TTX-s-Strömen. **A)** Repräsentative $Na_V1.8$ -Stromspuren von $Na_V1.9^{-/-}$ -Neuronen (links) beziehungsweise TTX-s-Stromspuren von $Na_V1.8^{-/-}$ -Neuronen (rechts) als Antwort auf das entsprechende Spannungsprotokoll (siehe Abb. 2.5). Grün markiert ist die Stromantwort für eine 500 ms-Spannung V_{inact} von -6 mV zwischen den beiden 10 ms-Testspannungen von jeweils -6 mV. **B)** Der durchschnittliche Quotient aus zweitem und erstem Strommaximum von $Na_V1.8$ - (schwarze Kreise) und TTX-s-Strömen (graue Dreiecke) aufgetragen über der Spannung V_{inact} . **C)** Halbmaximale Inaktivierungsspannung (links) und Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (rechts) von $Na_V1.8$ - (schwarze Kreise) und TTX-s-Strömen (graue Dreiecke). Die Fehlerbalken sind in den Datenpunkten enthalten.

sem Grund wurde die Gleichgewichtsinaktivierung nicht vor jeder Messung geprüft. Nach der Behandlung von DRG-Neuronen mit reaktiven Spezies waren die Stromantworten auf das Spannungsprotokoll zu stark schwankend, als dass zuverlässige Werte hätten ermittelt werden können.

3.3.5. Kinetik der Wirkung von Blaulicht und Chloramin-T auf Maximalstrom und Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Hinsichtlich der differentiellen Wirkung reaktiver Spezies auf $Na_V1.8$ und TTX-s-Kanäle gab es offenbar einen erheblichen zeitabhängigen Unterschied. Während $Na_V1.8$ 150 s nach Beginn der Erzeugung reaktiver Spezies durchschnittlich stärker modifiziert war als TTX-s-Ströme, so konnte nach 600 s kaum noch eine unterschiedliche oxidative Sensitivität festgestellt werden.

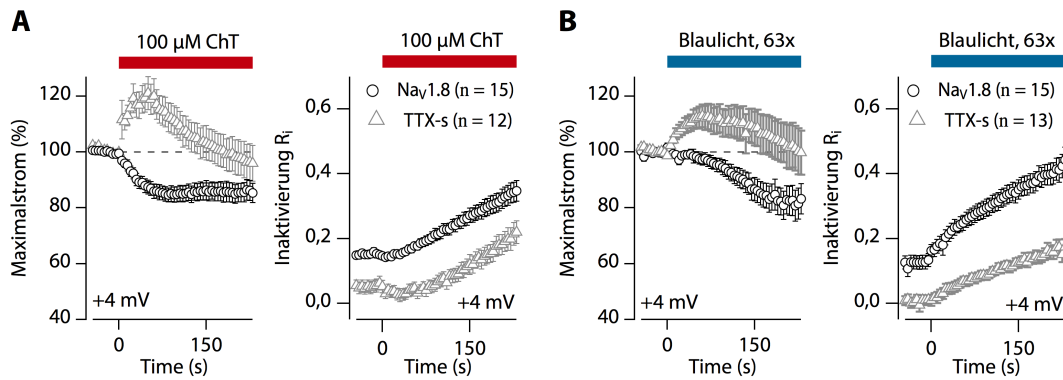


Abbildung 3.13.: Kinetik der Wirkung reaktiver Spezies. Durchschnittlicher Verlauf des normierten Maximalstroms (**A** und **B** jeweils links) und des Inaktivierungsindex (**A** und **B** jeweils rechts) von Na_V1.8 von Na_V1.9^{-/-}-Neuronen (schwarze Kreise) und TTX-s-Strömen von Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (graue Dreiecke) bei Erzeugung von reaktiven Spezies mit 100 µM Chloramin-T (**A**) beziehungsweise Blaulicht hoher Strahlungsleistung (**B**) zum Zeitpunkt 0 s bei einer Testspannung von +4 mV.

Deshalb wurde die Kinetik der Wirkung reaktiver Spezies näher betrachtet. Im Fall von Na_V1.8 findet eine schnelle Reduktion des Maximalstroms statt (Abb. 3.13 A). Demgegenüber zeigte die Kinetik der TTX-s-Kanäle einen schnellen Anstieg des Maximalstroms in den ersten 50 s bis 100 s nach der Applikation von ChT, bevor der Maximalstrom vermindert wurde. Die Verlangsamung der Inaktivierung von Na_V1.8 durch 100 µM ChT beginnt unverzüglich. Die Inaktivierung der TTX-s-Kanäle scheint anfänglich beschleunigt zu werden, bevor eine Verlangsamung eintritt.

Blaulicht hoher Strahlungsleistung führt zu einer im Vergleich zu ChT verzögerten Reduktion des Maximalstroms von Na_V1.8. TTX-s-Kanäle reagieren mit einem Anstieg des Maximalstroms, der im Durchschnitt nach 150 s in eine Verminderung des Maximalstroms umschlägt. Die Gegenüberstellung der Inaktivierung von Na_V1.8- und TTX-s-Kanälen zeigt, dass in beiden Fällen die Inaktivierung nach dem Beginn der Bestrahlung unverzüglich verlangsamt wurde, diese Verlangsamung im Falle von Na_V1.8 jedoch erheblicher war.

Insgesamt deutet die in Abbildung 3.13 gezeigte Gegenüberstellung von Na_V1.8 und TTX-s-Strömen darauf hin, dass sich Na_V1.8- und TTX-s-Kanäle vor allem innerhalb der ersten 150 s nach Einwirkung reaktiver Spezies unterscheiden. Nach 600 s war anzunehmen, dass sich sowohl Na_V1.8- als auch TTX-s-Kanäle bereits in oxidativer Sättigung befinden (siehe Abb. 3.11).

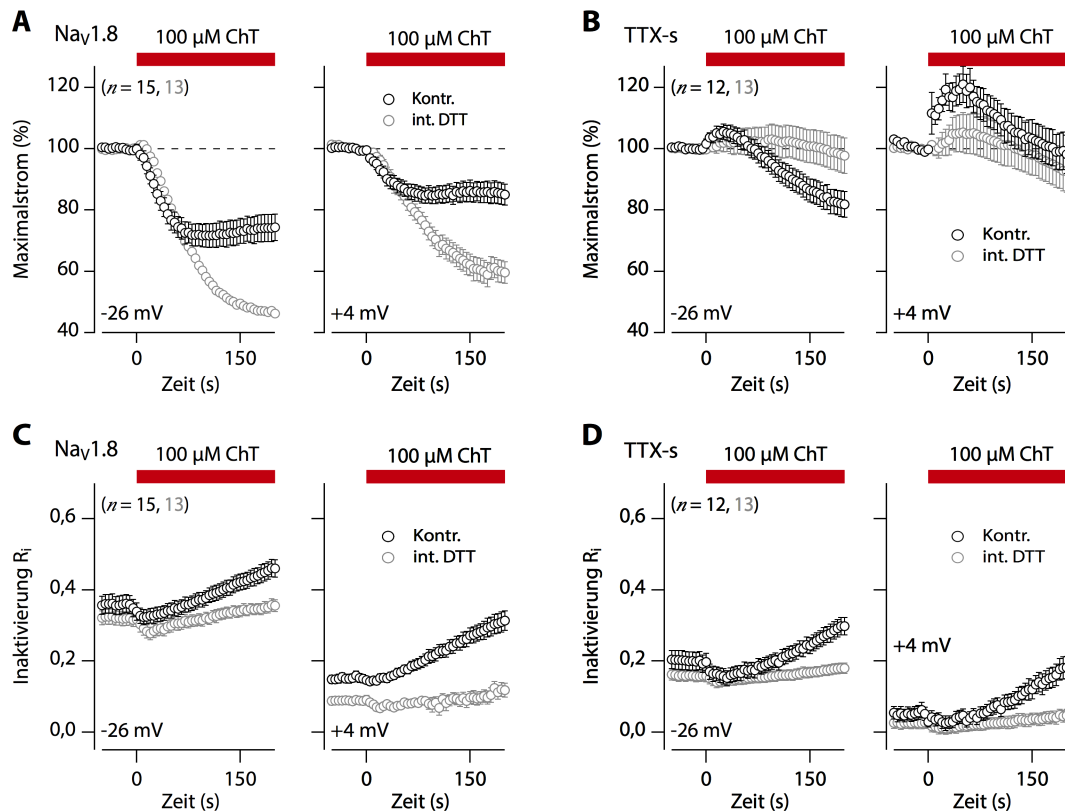


Abbildung 3.14.: Zeitlicher Verlauf von Maximalstrom und Inaktivierungsindex während der Behandlung mit Chloramin-T und in Gegenwart von intrazellulärem DTT. Durchschnittliche, normierte Antwort des Maximalstroms (**A, B**) und des Inaktivierungsindex (**C, D**) von Na_V1.8 von Na_V1.9^{-/-}-Neuronen (**A, C**) und TTX-s-Strömen von Na_V1.8^{-/-}-Neuronen (**B, D**) auf eine Testspannung von -26 mV (links) beziehungsweise +4 mV (rechts). Jeweils zum Zeitpunkt 0 s wurde die Badlösung gegen 100 µM ChT-haltige Badlösung ausgetauscht. Die Intrazellulärlösung enthielt entweder keine weiteren Zusätze (schwarz) oder 2 mM DTT (grau).

3.3.6. Dithiothreitol schützt die Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Dithiothreitol ist ein membranpermeables, starkes Reduktionsmittel, welches insbesondere schwefelhaltige Aminosäuren schützt beziehungsweise diese aus ihren eventuellen Oxidationsprodukten zurückgewinnen kann (Le *et al.*, 2008).

Bei Experimenten mit 2 mM DTT innerhalb der *patch*-Pipette zeigte sich ein wesentlich stärkerer Rückgang des Maximalstroms von Na_V1.8, sowohl bei -26 mV als auch bei +4 mV infolge der Applikation von 100 µM ChT (Abb. 3.14 A). Die größere Maximalstromreduktion zeigte sich bei der negativeren Testspannung von -26 mV.

In Gegenwart von DTT blieb die Inaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ infolge der ChT-Perfusion nahezu unverändert (Abb. 3.14 C). Auch TTX-s-Kanäle zeigten in Gegenwart von DTT eine deutlich verminderte Reaktion der Inaktivierung infolge der ChT-Behandlung im Vergleich zur Inaktivierungsverlangsamung ohne DTT. Der Maximalstrom der TTX-s-Kanäle verringerte sich wenig (Abb. 3.14 B, D). Auch der ohne DTT beobachtete anfängliche Anstieg des Maximalstroms bei beiden Testspannungen war deutlich vermindert. Auf Experimente mit DTT in der Badlösung wurde verzichtet, da es als wahrscheinlich angenommen wurde, dass infolge der stark reduktiven Wirkung von DTT die Konzentration des zur Zelle gelangenden Chloramin-T stark vermindert gewesen und so kein klar interpretierbares Resultat erhalten worden wäre.

Die bereits angesprochene Spannungsabhängigkeit wurde in Experimenten mit Blaulicht starker Strahlungsleistung noch offensichtlicher.

$\text{Na}_V1.8$ -Kanäle zeigten in Gegenwart von 2 mM DTT in der Pipette nur eine minimale Änderung des Maximalstroms bei -26 mV, wohingegen die Reduktion des Maximalstroms bei $+4$ mV nahezu unverändert blieb (Abb. 3.15 A). Die Änderung der Inaktivierung infolge der Blaulichtbestrahlung von $\text{Na}_V1.8$ konnte mit intrazellulärem DTT nicht verhindert werden (Abb. 3.15 C). Ähnlich wie anhand von Experimenten mit $100\text{ }\mu\text{M}$ Chloramin-T zu beobachten, führte intrazelluläres DTT bei TTX-s-Strömen unter Bestrahlung mit Blaulicht hoher Strahlungsleistung dazu, dass weder Maximalstrom noch Inaktivierung infolge der Bestrahlung nennenswert geändert wurden (Abb. 3.15 B, D).

Weil die Bestrahlung von Zellen mit blauem Licht zur Bildung reaktiver Spezies innerhalb der Zelle führt, wurden auch Experimente mit DTT in der Badlösung durchgeführt. Dadurch sollte geprüft werden, ob innerhalb der Zelle entstehende Radikale die Zellmembran passieren und Ionenkanäle an der Außenseite der Membran modifizieren können. In Gegenwart von extrazellulärem DTT führte die Bestrahlung mit blauem Licht zu einer ähnlich geringen Änderung des Maximalstroms von $\text{Na}_V1.8$ bei -26 mV wie sie auch in Gegenwart von intrazellulärem DTT zu beobachten war (Abb. 3.15 A). Extrazelluläres DTT führte im Gegensatz zu intrazellulärem DTT auch zu einer Reduktion des Maximalstromrückgangs von $\text{Na}_V1.8$ bei $+4$ mV. Weiterhin bewirkte extrazelluläres DTT eine beschleunigte Inaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ vor der Behandlung und eine deutlich geminderte Verlangsamung der Inaktivierung infolge der Blaulichtbestrahlung (Abb. 3.15 C).

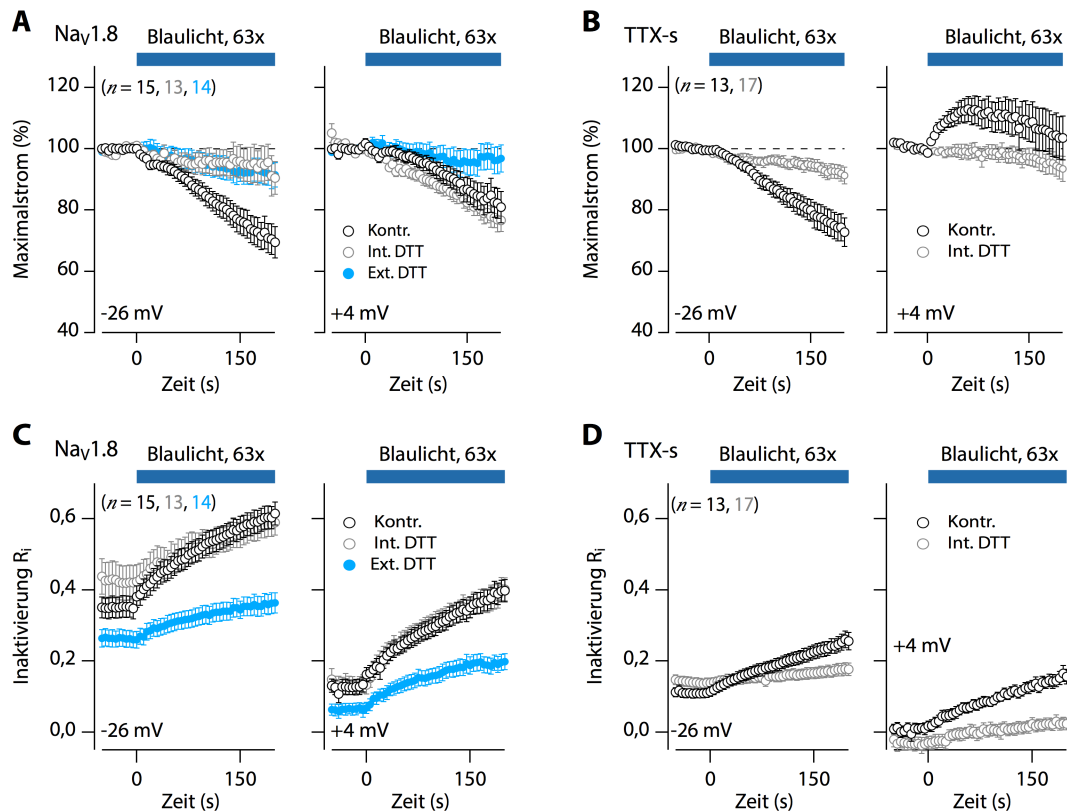


Abbildung 3.15.: Zeitlicher Verlauf von Maximalstrom und Inaktivierung während der Bestrahlung mit blauem Licht und in Gegenwart von DTT. Durchschnittliche, normierte Antwort des Maximalstroms (**A, B**) und des Inaktivierungsindex (**C, D**) von $\text{Na}_V1.8$ von $\text{Na}_V1.9^{-/-}$ -Neuronen (**A, C**) und TTX-s-Strömen von $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen (**B, D**) auf eine Testspannung von -26 mV (links) beziehungsweise $+4\text{ mV}$ (rechts). Jeweils zum Zeitpunkt 0 s wurden die Zellen kontinuierlich mit blauem Licht hoher Strahlungsleistung bestrahlt. Die Intrazellulärlösung enthielt entweder keine weiteren Zusätze (schwarz) oder 2 mM DTT (grau). Blau dargestellt sind Aufnahmen mit 2 mM DTT in der Badlösung.

3.3.7. Der spezifische Cystein-Modifikator DTNB verändert die Wirkung von ChT auf $\text{Na}_V1.8$ -Ströme nicht

Um die Rolle von Cysteinoxidationen bei der Vermittlung der Wirkung reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale bewerten zu können, wurden $\text{Na}_V1.8$ -Ströme in Gegenwart von $100\text{ }\mu\text{M}$ DTNB in der Badlösung untersucht. DTNB ist nicht membranpermeabel und modifiziert entsprechend nur Cysteinreste auf der Außenseite der Membran und macht diese damit von Beginn an unzugänglich für zusätzliche oxidative Modifikationen.

Über die zusätzliche äußere Behandlung mit Chloramin-T, bei gleichzeitiger Gegenwart von DTT innerhalb der *patch*-Pipette, sollte der Einfluss von Cysteinmodifikatio-

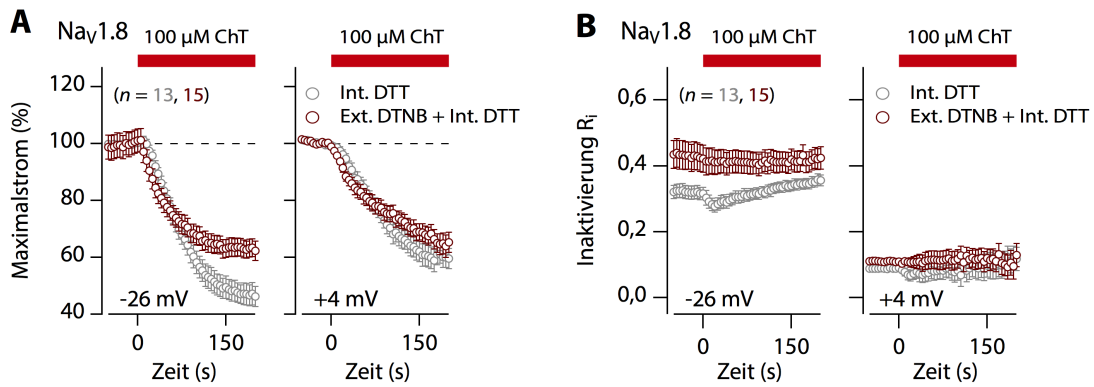


Abbildung 3.16.: Einfluss von Cysteinmodifikationen auf die Wirkung von Chloramin-T in Gegenwart von DTT. Durchschnittliche, normierte Antwort des Maximalstroms (A) und des Inaktivierungsindex (B) von $Na_V1.8$ von $Na_V1.9^{-/-}$ -Neuronen bei Spannungssprüngen auf -26 mV (links) und $+4\text{ mV}$ mit 2 mM DTT in der *patch*-Pipette (grau) oder zusätzlich $100\text{ }\mu\text{M DTNB}$ in der Badlösung (braun). Jeweils zum Zeitpunkt 0 s wurden $100\text{ }\mu\text{M ChT}$ appliziert.

nen mit dem Einfluss von durch ChT produzierten Methioninoxidationen verglichen werden.

Wie in Abbildung 3.16 A gezeigt, verminderte sich die Wirkung von ChT auf den Maximalstrom von $Na_V1.8$ in Gegenwart von extrazellulärem DTNB nur wenig. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zu den Experimenten mit intrazellulärem DTT, aber ohne DTNB, nach 150 s bei einer der beiden Spannungen festgestellt werden ($p > 0,1$). Die Inaktivierung war bereits vor Beginn der ChT-Applikation langsamer und änderte sich infolge der ChT-Behandlung auch nicht weiter (Abb. 3.16 B).

3.4. Chimäre Kanäle von $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ geben Aufschluss über Angriffsorte reaktiver Spezies

Der Kanal $Na_V1.8$ und TTX-sensitive Kanäle in Maus-DRG-Neuronen reagierten auf reaktive Spezies unterschiedlich. Um die molekularen Ursachen der besonderen Empfindlichkeit von $Na_V1.8$ gegenüber reaktiven Spezies innerhalb des Kanalproteins näher lokalisieren zu können, wurden chimäre Proteine genutzt. Diese waren unterschiedlich zusammengesetzt aus Teilen des Natriumkanals $Na_V1.8$ und des TTX-s-Kanals $Na_V1.4$, beide von *Rattus norvegicus*.

3.4.1. Chloramin-T reduziert den Maximalstrom von $rNa_v1.8$ aber nicht den Maximalstrom von $rNa_v1.4$

Der Kanal $rNa_v1.8$ wies im Vergleich zu den gemessenen $Na_v1.8$ -Strömen von $Na_v1.9^{-/-}$ -Neuronen der Maus als Antwort auf $100\text{ }\mu\text{M}$ ChT keine Abnahme des Maximalstroms bei $+4\text{ mV}$ auf ($p = 0,13$; Abb. 3.17 B und 3.18 B). Dies war scheinbar in der nach ungefähr 100 s stattfindenden Umkehr des Reduktionseffekts begründet, was in DRG-Neuronen nicht beobachtet wurde (vgl. Abb. 3.14 A). Die Reduktion des Maximalstroms war allerdings bei -26 mV signifikant ($-28,5 \pm 4,8\%$; $p = 0,006$). Die Inaktivierung von $rNa_v1.8$ war von Beginn an langsamer im Vergleich zur Inaktivierung von $Na_v1.8$ von DRG-Neuronen: $R_i = 0,46 \pm 0,02$ bei -26 mV gegenüber $R_i = 0,35 \pm 0,02$ in DRG-Neuronen beziehungsweise $R_i = 0,29 \pm 0,03$ bei $+4\text{ mV}$ gegenüber $R_i = 0,14 \pm 0,01$ in DRG-Neuronen (vgl. Abb. 3.18 C und 3.9 C).

Zu Beginn der Applikation trat bei $rNa_v1.8$ eine geringfügige Beschleunigung der Inaktivierung auf (Abb. 3.17 C), bevor sich diese vergleichbar mit den Untersuchungen an $Na_v1.8$ in DRG-Neuronen verlangsamte (vgl. Abb. 3.14 C).

Als repräsentativer TTX-s-Kanal wurde $rNa_v1.4$ gewählt, der infolge der Applikation von ChT keine signifikanten Änderungen des Maximalstroms zeigte (Abb. 3.17 E und 3.18 B) und eine zu den TTX-s-Kanälen von DRG-Neuronen vergleichbare, geringfügige Inaktivierungsverlangsamung aufwies, die im Gegensatz zu $rNa_v1.8$ auch signifikant war ($rNa_v1.4$, -26 mV : von $R_i = 0,035 \pm 0,068$ auf $R_i = 0,067 \pm 0,064$; $p = 0,00036$; $+4\text{ mV}$: von $R_i = 0,016 \pm 0,001$ auf $R_i = 0,051 \pm 0,008$; $p = 0,00014$; Abb. 3.17 F).

Intrazelluläres DTT änderte die ohnehin geringe Antwort von $rNa_v1.4$ auf $100\text{ }\mu\text{M}$ ChT nicht. Dies war ein Unterschied zu TTX-s-Kanälen von DRG-Neuronen. Die Verlangsamung der Inaktivierung als Antwort auf $100\text{ }\mu\text{M}$ ChT war im Fall von TTX-s-Kanälen durch DTT blockiert (vgl. Abb. 3.14 D). In ND7/23-Zellen verlangsamte sich die Inaktivierung von $rNa_v1.4$ mit intrazellulärem DTT in einem ähnlichen Ausmaß wie ohne DTT und ebenfalls signifikant ($p = 0,010$ bei -26 mV beziehungsweise $p = 0,015$ bei $+4\text{ mV}$; Abb. 3.18 F).

Im Gegensatz zu $Na_v1.8$ von DRG-Neuronen zeigten Experimente mit $rNa_v1.8$ und 2 mM DTT in der *patch*-Pipette keinen signifikanten Einfluss auf die durch ChT verursachte Änderung sowohl des Maximalstroms als auch der Inaktivierung (Abb. 3.17 C). Die Inaktivierung vor Beginn der Applikation war geringfügig schneller.

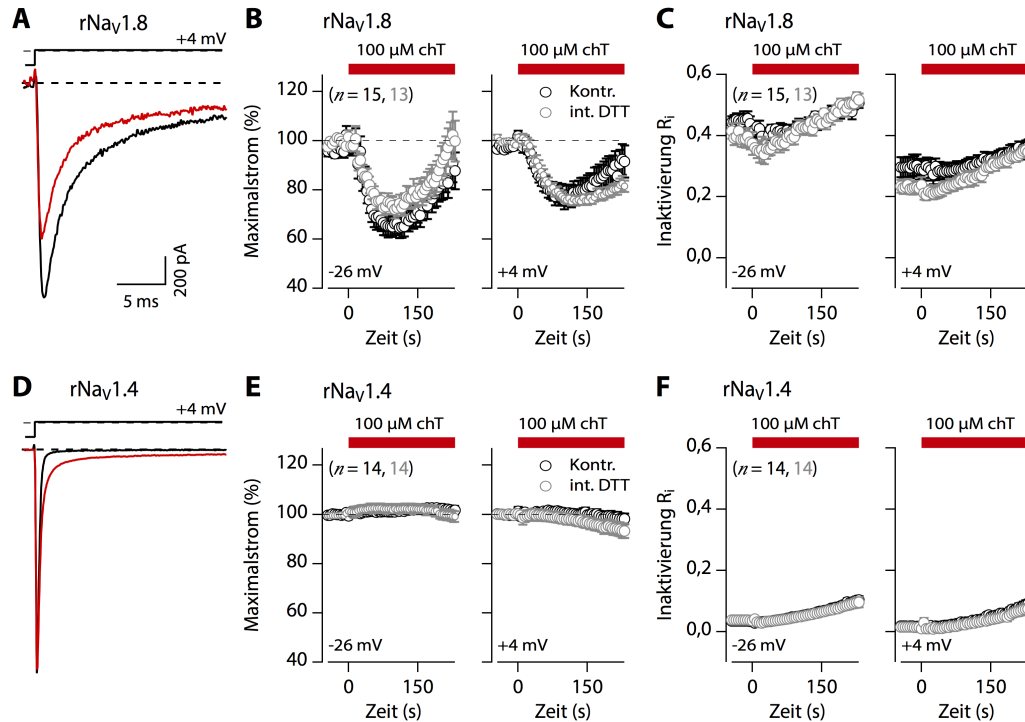


Abbildung 3.17.: Einfluss von 100 μ M ChT auf $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ in ND7/23-Zellen. A, D) Repräsentative Stromspuren vor (schwarz) und 150 s nach Applikation mit 100 μ M ChT (rot) bei einer Testspannung von +4 mV. Zeitlicher Verlauf des normierten Maximalstroms (B, E) beziehungsweise des Inaktivierungsindex (C, F) bei -26 mV (links) und +4 mV (rechts), ohne DTT (schwarz) oder mit 2 mM DTT intrazellulär (grau). Der Badaustausch mit 100 μ M ChT-haltiger Badlösung erfolgte zum Zeitpunkt 0 s.

3.4.2. Kanalchimären weisen auf Besonderheiten der Domänen I und II von $rNa_V1.8$ hin

Chloramin-T in einer Konzentration von 100 μ M führte zu Veränderungen an $rNa_V1.8$ -Kanälen, die deutlich von denen ab $rNa_V1.4$ -Kanälen unterscheidbar waren. Aus diesem Grund wurden Kanalchimären aus $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ eingesetzt, um molekulare Angriffsorte von $rNa_V1.8$ zu identifizieren, die für die ChT-induzierte Maximalstromreduktion verantwortlich sind (siehe Abschnitt 2.4.1 und Abb. 2.1).

Bei den Chimären r8844 und r4488 bilden die Kanäle $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ jeweils eine Hälfte eines funktionellen Kanals, vom N-Terminus bis zur Domäne II und von Domäne III bis zum C-Terminus. Wie in Abbildung 3.18 B zu sehen, zeigte die Chimäre r8844 eine gegenüber dem Wildtyp $rNa_V1.8$ stärkere Reduktion des Maximalstroms infolge der Applikation von 100 μ M ChT, um $-42,7 \pm 2,4 \%$ ($p = 0,048$). Auch stieg der Maximalstrom im Vergleich zum Wildtyp mit der Zeit langsamer wieder an. Die Re-

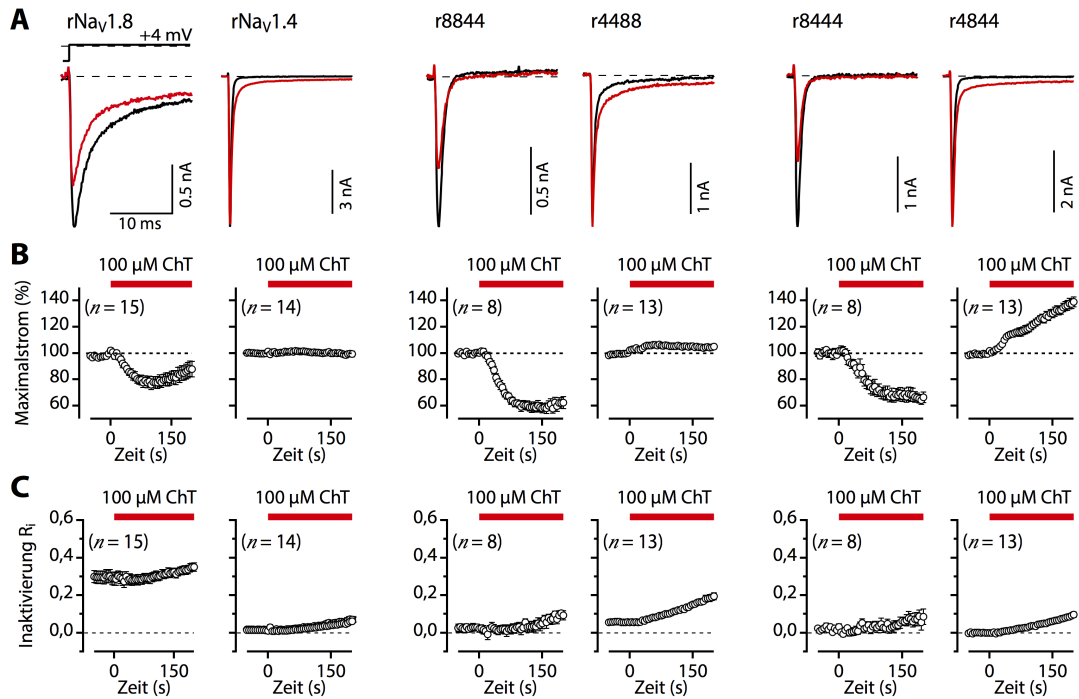


Abbildung 3.18.: Änderung von Maximalstrom und Inaktivierung der chimären Konstrukte infolge der Perfusion mit Chloramin-T. **A)** Repräsentative Stromspuren bei +4 mV vor (schwarz) und 150 s nach der Perfusion von 100 μM ChT (rot). Verlauf des normierten Maximalstroms (**B**) beziehungsweise des Inaktivierungsindex (**C**) bei einem Spannungssprung auf +4 mV infolge des Badaustauschs mit 100 μM ChT-haltiger Badlösung zum Zeitpunkt 0 s.

duktion des Maximalstroms bei +4 mV um $-41,7 \pm 3,4 \%$ ($p = 0,001$) war vergleichbar mit der Reduktion bei -26 mV. Die Inaktivierung von r8844 wurde bei beiden Testspannungen signifikant verlangsamt, vor allem aber bei -26 mV von $R_i = 0,15 \pm 0,03$ auf $R_i = 0,22 \pm 0,03$ ($p = 0,005$; Abb. 3.19 C).

Die Inaktivierung der Chimäre r4488 wurde mit der Zeit infolge der ChT-Applikation ebenfalls bei beiden Testspannungen signifikant verlangsamt, bei -26 mV vergrößerte sich der Inaktivierungsindex R_i von $0,123 \pm 0,008$ auf $R_i = 0,210 \pm 0,010$ ($p = 2 \cdot 10^{-6}$) und bei +4 mV von $R_i = 0,057 \pm 0,006$ auf $R_i = 0,153 \pm 0,013$ ($p = 5 \cdot 10^{-5}$; Abb. 3.19 B). Diese Verlangsamung war entsprechend prägnanter als bei r8844. Der Maximalstrom von r4488 erhöhte sich signifikant, bei -26 mV um $16,7 \pm 0,3 \%$ ($p = 8 \cdot 10^{-5}$) und bei +4 mV um $4,9 \pm 1,5 \%$ ($p = 0,023$; Abb. 3.19 A).

Da die Maximalstromänderungen klar unterscheidbar waren und die Domänen I und II des Kanals $rNa_V1.8$ für die beobachtete Reduktion verantwortlich zu sein schienen, sollte dieser Effekt mit zwei weiteren Chimären weiter eingegrenzt werden. Dabei stellte

3.4. Chimäre Kanäle von $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ geben Aufschluss über Angriffsorte reaktiver Spezies

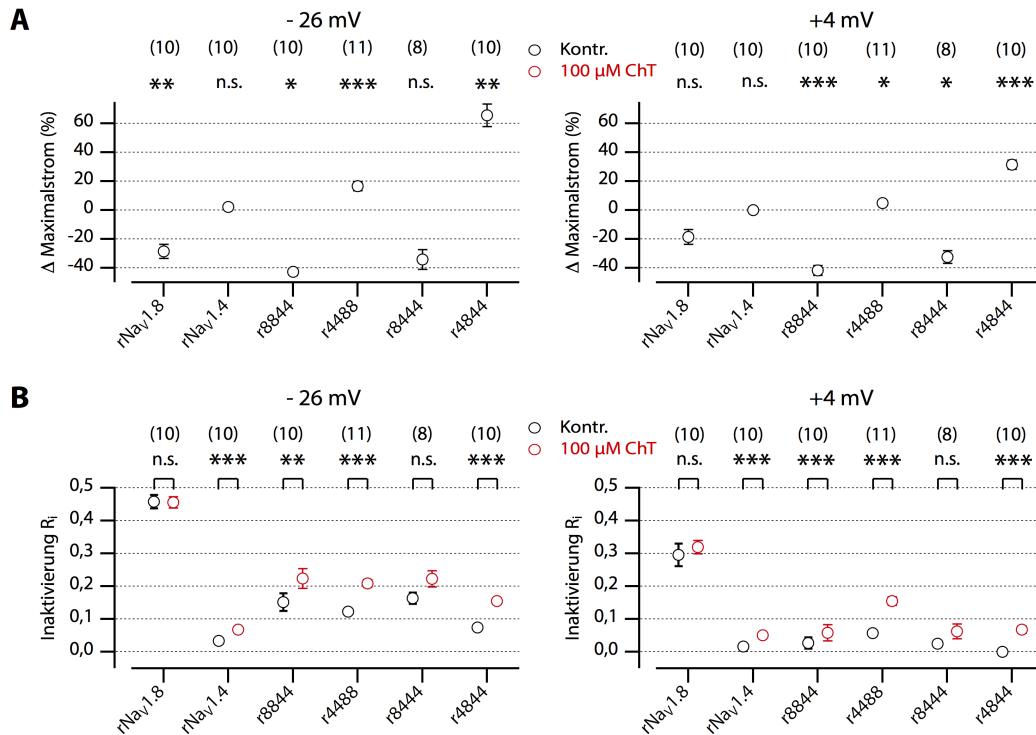


Abbildung 3.19.: Spannungsabhängigkeit der Wirkung reaktiver Spezies auf Kanalchimären. **A**) Änderung des Maximalstroms 150 s nach dem Badaustausch mit 100 μM-haltiger ChT-Lösung bei Spannungssprüngen auf -26 (links) und +4 mV (rechts). **B**) Inaktivierungsindex vor (schwarz) und 150 s nach dem Badaustausch mit 100 μM-haltiger ChT-Lösung (rot) bei Spannungssprüngen auf -26 (links) und +4 mV (rechts).

$rNa_V1.8$ jeweils nur die erste oder nur die zweite Domäne eines funktionellen Kanals, während der Rest von $rNa_V1.4$ stammte.

Die Inaktivierung der Chimäre r8444 wurde nicht signifikant verlangsamt, wobei dies vermutlich vor allem an der Heterogenität der Ergebnisse liegt, da die Inaktivierung in etwa der Hälfte der Messungen der Chimäre r8444 gar nicht verlangsamt wurde (Abb. 3.19 C).

Der Maximalstrom wurde bei +4 mV signifikant reduziert um $-34,2 \pm 0,7\%$ ($p = 0,02$), wobei die Ergebnisse wiederum sehr unterschiedlich waren (Abb. 3.19 B). In Abbildung 3.18 B ist gezeigt, dass der Maximalstrom von r8444 bei +4 mV monoton reduziert wurde und auch nicht wieder anstieg. Die Domäne I von $rNa_V1.8$ scheint also für den überwiegenden Teil der Maximalstromreduktion verantwortlich zu sein.

Die Chimäre r4844 zeigte eine signifikant verlangsamte Inaktivierung bei beiden Spannungen bei -26 mV von $R_i = 0,075 \pm 0,005$ auf $R_i = 0,155 \pm 0,009$ ($p = 1 \cdot 10^{-7}$) und

bei +4 mV von $R_i = 0,000\,01 \pm 0,006\,00$ auf $R_i = 0,068 \pm 0,010$ ($p = 2 \cdot 10^{-6}$; Abb. 3.19 B). Der Maximalstrom erhöhte sich bei -26 mV um $65,7 \pm 0,8\%$ ($p = 0,007$) und bei +4 mV um $31,5 \pm 0,3\%$ ($p = 0,0001$; Abb. 3.19 A).

Die Kombination der durch Domäne I und II vermittelten Effekte – Reduktion des Maximalstroms versus Erhöhung – erklärt die bei -26 mV der Maximalstromreduktion folgende Erhöhung des Maximalstroms mit der Zeit, sichtbar vor allem bei der Chimäre r8844 und dem Wildtyp-Kanal $Na_V1.8$ (Abb. 3.18 B).

3.4.3. IFC-Chimären zeigen die Wirkung von Chloramin-T bei besonders oxidationsempfindlicher Inaktivierung

Die vorangegangenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass reaktive Spezies auch bei heterolog exprimierten Kanälen eine komplexe Veränderung der gekoppelten Prozesse Aktivierung und Inaktivierung bewirken. Daher wurden Chimären verwendet, die analog zu den unter Abschnitt 3.4.2 beschriebenen aufgebaut waren, allerdings über einen Cystein- statt einem Methioninrest im Inaktivierungsmotiv verfügten („IFC“). Dieser Aminosäureaustausch machte die Chimären besonders empfindlich gegenüber oxidativen Modifikationen. Außerdem sollte DTNB, eine Cystein-modifizierende Substanz, in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt werden, um die Inaktivierung vor Beginn der ChT-Perfusion quantitativ zu verlangsamen. Anschließend wurde abermals 100 μ M ChT zum Bad hinzugegeben. So sollte überprüft werden, ob sich der Effekt der Reduktion des Maximalstroms auch bei von Beginn an verlangsamer Inaktivierung beobachten lässt.

Der Kanal $rNa_V1.8$ -IFC hatte durch die Wirkung des DTNBs vor Beginn der Messung eine deutlich verlangsamte Inaktivierung ($R_i = 0,73 \pm 0,07$ bei +4 mV). Diese konnte entsprechend des Inaktivierungsparameters R_i durch die folgende Applikation von 100 μ M ChT weiter verlangsamt werden auf $R_i = 0,97 \pm 0,02$ ($p = 0,005$; Abb. 3.20 A – C und Abb. 3.21). In einigen Fällen, beispielsweise im Fall von $rNa_V1.8$ -IFC bei -26 mV, war die Inaktivierung so stark verlangsamt, dass der Strom während eines 20 ms-Testspannungssprungs nicht sein endgültiges Maximum erreichte. Die somit theoretischen Werte von R_i größer als „1“ wurden in diesen Fällen für die Analyse per Hand „1“ gleichgesetzt.

Der Maximalstrom von $rNa_V1.8$ -IFC erhöhte sich bei +4 mV um $126,2 \pm 21,2\%$ ($p = 0,002$; Abb. 3.21).

Der Kanal $Na_V1.4$ -IFC zeigte eine wenig verlangsamte Inaktivierung durch intrazelluläres DTNB im Unterschied zu $rNa_V1.8$ -IFC ($Na_V1.4$ -IFC: $R_i = 0,033 \pm 0,006$ bei +4 mV; Abb. 3.20 C) und unterschied sich kaum vom $rNa_V1.4$ -Wildtyp (vgl. Abb. 3.18 C).

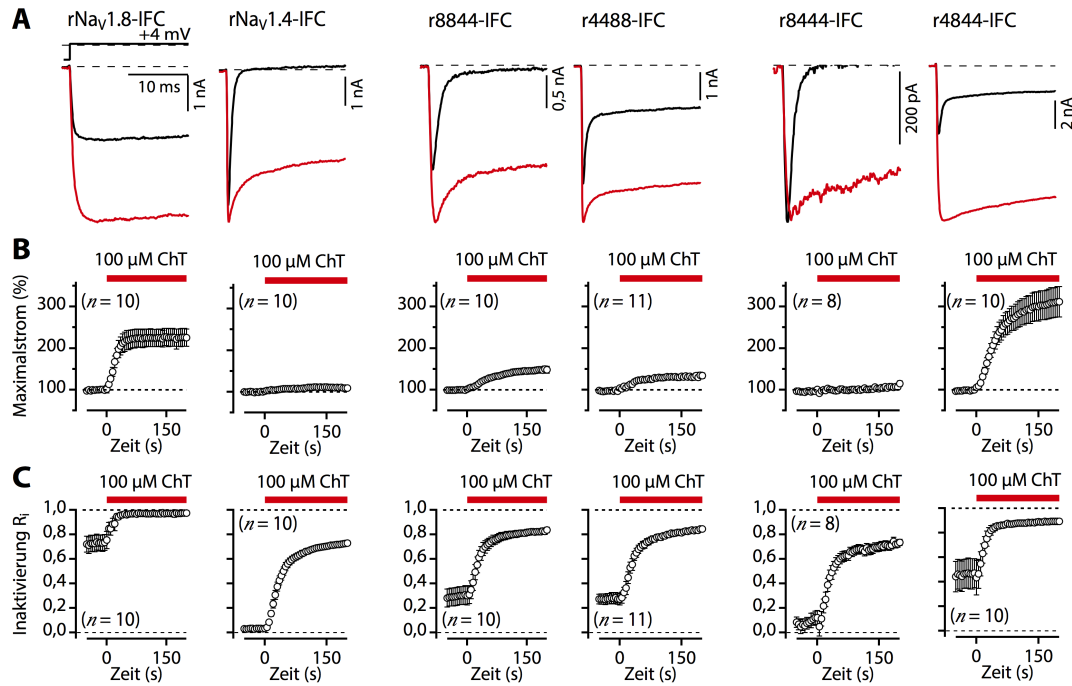


Abbildung 3.20.: Änderung von Maximalstrom und Inaktivierungsindex der IFC-Chimären infolge der Perfusion mit Chloramin-T. A) Repräsentative Stromspuren bei +4 mV vor (schwarz) und 150 s nach (rot) der Perfusion von 100 µM ChT in Gegenwart von 100 µM intrazellulärem DTNB. **B, C)** Verlauf des normierten Maximalstroms beziehungsweise des Inaktivierungsindex bei einem Spannungssprung auf +4 mV infolge des Badaustauschs mit 100 µM ChT-haltiger Badlösung zum Zeitpunkt 0 s.

Die folgende Applikation von 100 µM ChT führte jedoch zu einer deutlichen Verlangsamung der Inaktivierung, die allerdings nicht vollständig war ($R_i = 0,71 \pm 0,02$ bei +4 mV). Der Strom von $rNa_V1.4$ -IFC änderte sich bei einer Spannung von +4 mV im starken Kontrast zu $rNa_V1.8$ -IFC nicht signifikant ($p > 0,1$).

Die Chimären r8844-IFC und r4488-IFC reagierten im Unterschied zu den Wildtyp-Varianten sehr ähnlich auf reaktive Spezies im direkten Vergleich. Die Inaktivierung war bei beiden IFC-Chimären vor Beginn der Messung auf ein Niveau zwischen dem von $rNa_V1.8$ -IFC und $rNa_V1.4$ -IFC verlangsamt und konnte durch die ChT-Applikation weiter deutlich verlangsamt werden, ebenfalls auf einen Wert, der zwischen dem von $rNa_V1.8$ -IFC und $rNa_V1.4$ -IFC nach der ChT-Applikation lag (Abb. 3.20 C). Bei beiden Chimären war ein Zuwachs des Maximalstroms festzustellen (Abb. 3.20 B).

Ein großer Unterschied zeigte sich hinsichtlich der Inaktivierung der Chimären r8444-IFC und r4844-IFC. Während das Startniveau der Inaktivierung im Falle von r8444-IFC ungefähr das von $rNa_V1.4$ -IFC erreichte (r8444-IFC bei +4 mV: $R_i = 0,095 \pm 0,005$), war

3.4. Chimäre Kanäle von $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ geben Aufschluss über Angriffsorte reaktiver Spezies

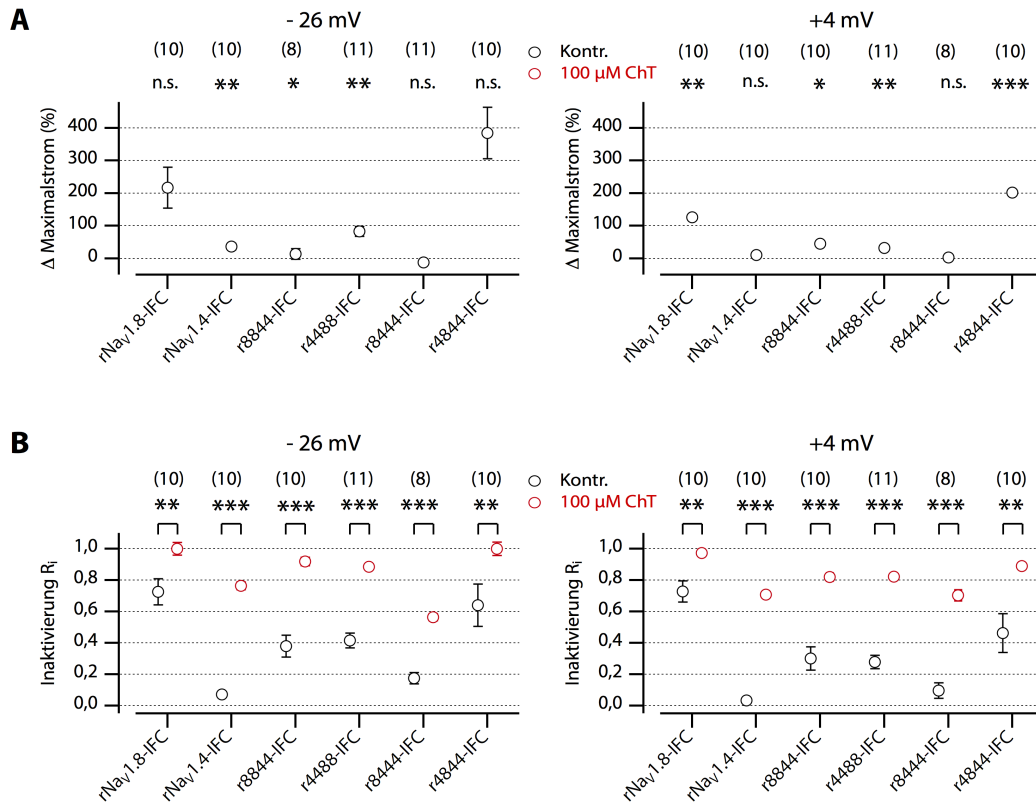


Abbildung 3.21.: Spannungsabhängigkeit der Wirkung reaktiver Spezies auf IFC-Kanalchimären. A) Änderung des Maximalstroms 150 s nach dem Badaustausch mit 100 μM-haltiger ChT-Lösung bei Spannungssprüngen auf –26 (links) und +4 mV (rechts). **B)** Inaktivierungsindex vor (schwarz) und 150 s nach dem Badaustausch mit 100 μM-haltiger ChT-Lösung (rot) bei Spannungssprüngen auf –26 (links) und +4 mV (rechts).

das Startniveau der Inaktivierung im Fall von r4844-IFC sogar langsamer als bei r8844-IFC (r4844-IFC bei +4 mV: $R_i = 0,46 \pm 0,12$); Abb. 3.21 B). Die Verlangsamung der Inaktivierung infolge der ChT-Perfusion war bei r4844-IFC deutlicher als bei r8444-IFC. Der Maximalstrom von r8444-IFC änderte sich nicht (Abb. 3.20 B). Hingegen sorgte die Perfusion mit 100 μM ChT bei r4844-IFC zu einem starken Zuwachs des Maximalstroms um $202,4 \pm 34,8 \%$ bei +4 mV ($p = 0,0009$), ein Zuwachs der noch größer war als der von rNav1.8-IFC (Abb. 3.21 A).

Intrazelluläres DTNB war nicht geeignet, die Inaktivierung der IFC-Chimären quantitativ zu verlangsamen, da die äußere Applikation von Chloramin-T immer noch eine zusätzliche Verlangsamung der Inaktivierung zur Folge hatte.

Deshalb wurden die gut exprimierenden Konstrukte r8844-IFC und r4488-IFC gewählt und statt 100 μM DTNB 1 mM ChT in die Intrazellulärlösung gegeben, um vor der

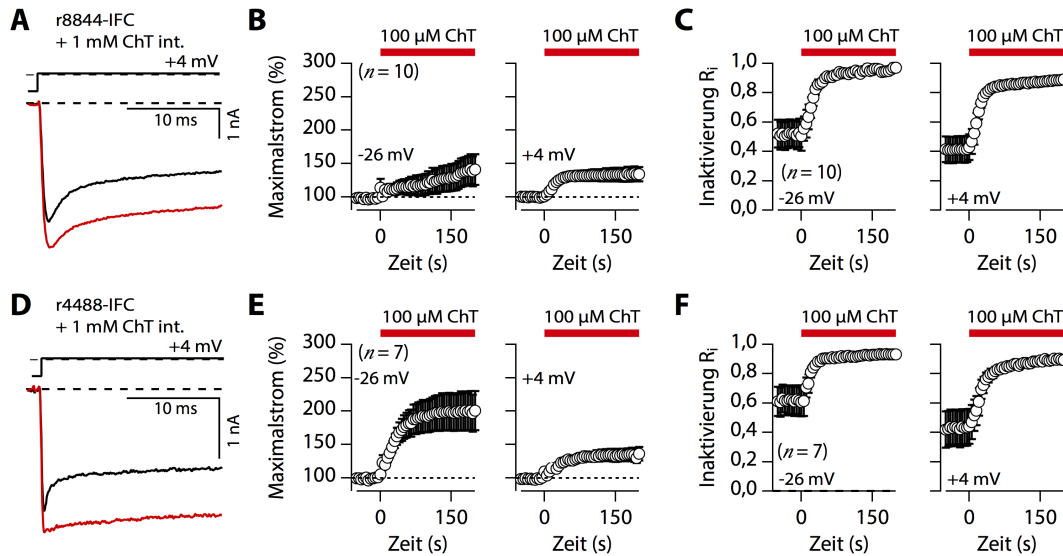


Abbildung 3.22.: Einfluss von 100 μ M ChT auf r8844-IFC und r4488-IFC mit 1 mM ChT intrazellulär. A, D) Repräsentative Stromspuren vor (schwarz) und 150 s nach der extrazellulären Applikation von 100 μ M ChT (rot) bei einer Testspannung von +4 mV. Zeitlicher Verlauf des normierten Maximalstroms (B, E) beziehungsweise des Inaktivierungsindex (C, F) bei -26 mV (links) und +4 mV (rechts). Der Badaustausch mit 100 μ M ChT-haltiger Badlösung erfolgte zum Zeitpunkt 0 s.

folgenden Perfusion mit 100 μ M ChT von außen bereits eine oxidative Sättigung über die Intrazellulärlösung zu erreichen.

Auch diese hohe Konzentration von ChT in der Intrazellulärlösung vermochte nicht, die Inaktivierung der Chimären bereits vor der ChT-Perfusion quantitativ zu verlangsamen, bei +4 mV betrug R_i für r8844-IFC $0,42 \pm 0,08$ und für r4488-IFC $0,43 \pm 0,12$ (Abb. 3.22 C und F). Infolge der ChT-Applikation von außen wurde die Inaktivierung weiter verlangsamt und der Maximalstrom bei +4 mV stieg bei r8844-IFC um $33,3 \pm 10,1 \%$ ($p = 0,015$) und ebenso bei r4488-IFC um $33,3 \pm 9,0 \%$ ($p = 0,004$) an. Es zeigte sich eine Spannungsabhängigkeit der Chimäre r4488-IFC insofern, dass der Maximalstrom bei -26 mV deutlich stärker erhöht wurde als bei +4 mV, um $98,2 \pm 27,4 \%$ ($p = 0,0026$), während der Maximalstrom der Chimäre r8844-IFC bei dieser Spannung nicht geändert wurde.

Im Zusammenhang mit der unvollständigen Verlangsamung der Inaktivierung durch DTNB wurde dies als Indiz gewertet, dass die Diffusion von Substanzen in der Intrazellulärlösung innerhalb der gesamten Zelle nicht schnell genug war.

Als letzte Möglichkeit, eine quantitative Verlangsamung der Inaktivierung zu erzielen, wurde daher die intrazelluläre Applikation von *Lucifer yellow* genutzt. Unter Bestrahlung

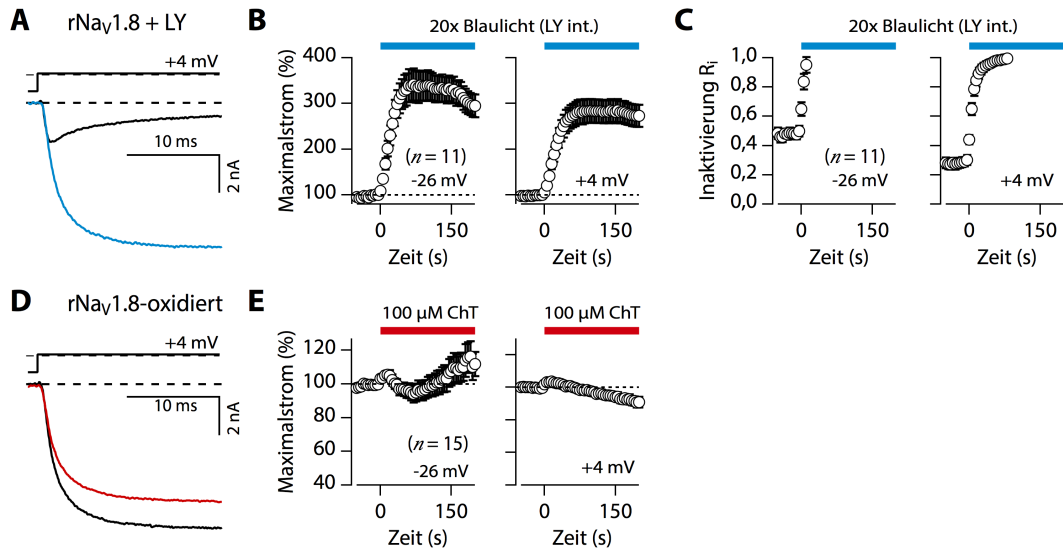


Abbildung 3.23.: Einfluss von 100 μ M ChT auf $rNa_v1.8$ -IFC und mit *Lucifer yellow* und Blaulichtbestrahlung voroxidierten $rNa_v1.8$ -IFC-Kanälen. **A)** Repräsentative Stromspuren von $rNa_v1.8$ vor (schwarz) und 100 s nach Bestrahlung der Zellen mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung und 1 mM *Lucifer yellow* intrazellulär (blau) bei einer Testspannung von +4 mV. Zeitlicher Verlauf des normierten Maximalstroms (**B**), beziehungsweise des Inaktivierungsindex (**C**) bei -26 mV (links) und +4 mV (rechts). **D)** Repräsentative Stromspuren von durch *Lucifer yellow* und Blaulichtbestrahlung bereits oxidiertem $rNa_v1.8$ vor (schwarz) und 150 s nach Applikation von 100 μ M ChT (rot). Zeitlicher Verlauf des normierten Maximalstroms (**E**) bei -26 mV (links) und +4 mV (rechts). Beginn der Behandlung jeweils zum Zeitpunkt 0 s. Die Inaktivierung der voroxidierten $rNa_v1.8$ -IFC-Kanäle ist nicht gezeigt, da der Wert des Inaktivierungsindex nach der Wirkung von *Lucifer yellow* bereits größer 1 war und entsprechend keine Inaktivierung mehr festgestellt werden konnte.

mit blauem Licht niedriger Strahlungsleistung zerfällt *Lucifer yellow* und bildet reaktive Spezies. Die genaue Art der gebildeten reaktiven Spezies ist unbekannt. Des Weiteren wirkt *Lucifer yellow* sehr unspezifisch, sodass die mit bisherigen Oxidanzien gewünschte Spezifität für Cystein- und Methioninreste nicht aufrecht erhalten werden konnte.

In Abbildung 3.23 ist gezeigt, dass es durch 1 mM intrazellulärem *Lucifer yellow*, kombiniert mit der Bestrahlung mit blauem Licht niedriger Strahlungsleistung möglich war, innerhalb von 50 s bis 100 s eine quantitative Verlangsamung der Inaktivierung zu erzielen (Abb. 3.23 C). Gleichzeitig vervielfachte sich der Maximalstrom. Mit der Zeit der Bestrahlung nahm der Maximalstrom wieder ab, was auf die oxidative Zerstörung von Natriumkanälen zurückgeführt wurde. Deshalb wurde das blaue Licht ausgeschaltet, wenn abzusehen war, dass die maximale Zunahme des Stroms erreicht wurde.

Die anschließende Applikation von 100 μ M ChT hatte auf die auf diese Weise voroxidierten Kanäle keinen signifikanten Einfluss mehr weder auf die Inaktivierung, noch den

Maximalstrom (Abb. 3.23 D und E). Dieses Ergebnis lässt sich damit begründen, dass *Lucifer yellow* und die membrangängigen gebildeten reaktiven Spezies womöglich auch die sonst von ChT angegriffenen extrazellulären Angriffsorte bereits oxidiert hatten.

3.4.4. Chloramin-T reduziert den Maximalstrom auch bei geringerer Oxidationsempfindlichkeit der Inaktivierung

Es war offensichtlich nicht möglich, die Inaktivierung der IFC-Chimären zu verlangsamen, ohne durch einen Überschuss an reaktiven Spezies sämtliche oxidative Ziele innerhalb des Proteins mitzuoxidieren und die Kanäle damit zu schädigen.

Deshalb sollte umgekehrt der Einfluss reaktiver Spezies bei besonders Redox-unempfindlicher Kanalinaktivierung untersucht werden. Deshalb wurde eine Variante des Kanals $rNa_V1.8$ untersucht, bei der das Methionin des Inaktivierungsmotiv gegen ein Leucin getauscht wurde („ $rNa_V1.8$ -IFL“). Damit sollte der Kanal zumindest an dieser kritischen Position unempfindlich gegenüber Oxidationen sein.

Die Inaktivierung der Chimäre $rNa_V1.8$ -IFL war von Beginn an deutlich langsamer mit $R_i = 0,46 \pm 0,07$ als die vom Wildtyp-Kanal $rNa_V1.8$ mit $R_i = 0,30 \pm 0,03$ (Abb. 3.24 C, vgl. mit 3.19 B). Es zeigte sich, dass $rNa_V1.8$ -IFL in seinem Inaktivierungsverhalten infolge der ChT-Applikation bei beiden untersuchten Testspannungen nicht signifikant verändert wurde. Chloramin-T führte bei $rNa_V1.8$ -IFL zu einer Reduktion des Maximalstroms um $22,7 \pm 5,5 \%$ bei +4 mV, wodurch sich der Kanal signifikant von dem Wildtyp-Kanal $rNa_V1.8$ unterschied. Es war außerdem keine ausgeprägte Tendenz zu einer Stromzunahme nach etwa 100 s wie beim Wildtyp-Kanal zu beobachten war, vorhanden (Abb. 3.24 B).

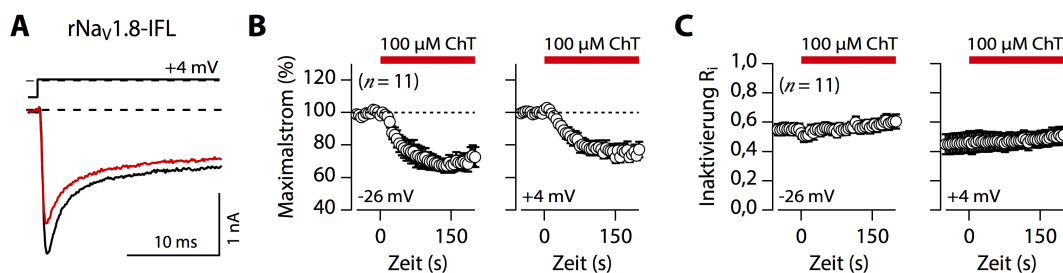


Abbildung 3.24.: Wirkung von 100 μ M ChT auf $rNa_V1.8$ -IFL. A) Repräsentative Stromspuren vor (schwarz) und 150 s nach der extrazellulären ChT-Applikation (rot) bei einer Testspannung von +4 mV. Zeitlicher Verlauf des normierten Maximalstroms (B), beziehungsweise der Inaktivierung (C) bei -26 mV (links) und +4 mV (rechts). Der Badaustausch mit 100 μ M ChT-haltiger Badlösung erfolgte zum Zeitpunkt 0 s.

3.4.5. Analyse der Strom-Spannungsbeziehungen der Chimären

Um weitere Informationen über die Ursache des Unterschieds der einzelnen chimären Konstrukte zu erlangen, wurden die Strom-Spannungsbeziehungen der Chimären vor und nach der Wirkung von Chloramin-T verglichen und gemäß Gleichung 2.1 ausgewertet. Die Analyse der Aktivierung der Chimären ohne IFC-Inaktivierungsmotiv zeigte, dass $rNa_V1.8$ bei $-25,7 \pm 1,7$ mV halbmaximal aktiviert wurde, $rNa_V1.4$ hingegen bereits bei $-48,4 \pm 2,0$ mV halbmaximal aktiviert wurde (Abb. 3.25 B, C). Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung von $rNa_V1.8$ wurde infolge der Wirkung von $100 \mu\text{M}$ ChT nicht signifikant verschoben ($p > 0,1$), was sich mit den Ergebnissen von $Na_V1.8$ von $Na_V1.9^{-/-}$ -Maus-Neuronen deckte.

Die halbmaximale Aktivierung des Kanals $rNa_V1.4$ wurde dagegen infolge der ChT-Perfusion um $-10,9 \pm 2,5$ mV, entsprechend hin zu einer negativeren Membranspannung, verschoben ($p = 0,002$), womit dieser Effekt mit der Wirkung von Chloramin-T auf TTX-s-Kanäle in $Na_V1.8^{-/-}$ -Neuronen vergleichbar war. Die Spannungsabhängigkeit des Kanals $rNa_V1.8$ wurde um $3,8 \pm 1,3$ mV vergrößert ($p = 0,03$) und blieb bei $rNa_V1.4$ unverändert (Abb. 3.25 B).

Die Chimäre r8844 wies ähnliche geringe Änderungen wie der Kanal $rNa_V1.8$ auf. Die halbmaximale Aktivierungsspannung änderte sich nicht ($p = 0,20$). Die Spannungsabhängigkeit von r8844 vergrößerte sich infolge der Wirkung von Chloramin-T dagegen um $9,4 \pm 2,1$ mV ($p = 0,007$), der größte Zuwachs aller untersuchten Chimären ohne „IFC“-Aminosäureaustausch. Die Chimäre r4488 war dem Kanal $rNa_V1.4$ sehr ähnlich und wurde in der Spannungsabhängigkeit nicht geändert ($p = 0,07$). Die halbmaximale Aktivierungsspannung verschob sich aber um $-13,7 \pm 1,5$ mV auf $-56,8$ mV ($p = 1$; Abb. 3.25).

Die Chimäre r8444 zeigte eine Verschiebung der Aktivierung um $-10,8 \pm 0,3$ mV ($p = 0,023$) infolge des Einflusses von $100 \mu\text{M}$ und zusätzlich eine deutliche Vergrößerung der Spannungsabhängigkeit um $8,8 \pm 2,1$ mV ($p = 0,015$). Im Vergleich verschob sich die halbmaximale Aktivierungsspannung bei r8444 von $-27,1 \pm 1,0$ mV auf $-37,5 \pm 1,5$ mV wobei die Spannungsabhängigkeit unverändert blieb.

Die Chimäre $rNa_V1.8$ -IFL, deren Inaktivierungsmotiv nicht oxidationsempfindlich war, besaß vergleichbare Aktivierungsparameter wie der Wildtyp mit einer halbmaximalen Aktivierungsspannung von $-25,0 \pm 2,4$ mV und einer Spannungsabhängigkeit von $13,1 \pm 2,6$ mV. Infolge der Wirkung von Chloramin-T verschob sich die halbmaximale Aktivierungsspannung um $-7,2 \pm 1,6$ mV.

Bei den Chimären mit IFC-Inaktivierungsmotiv zeigten sich vergleichbare Unterschiede der Chimären untereinander hinsichtlich ihrer Aktivierungseigenschaften. So lag V_m von $rNa_V1.8$ -IFC vergleichbar zum Wildtyp bei $-24,5 \pm 2,1$ mV, wurde allerdings an-

3.4. Chimäre Kanäle von rNa_v1.8 und rNa_v1.4 geben Aufschluss über Angriffsorte reaktiver Spezies

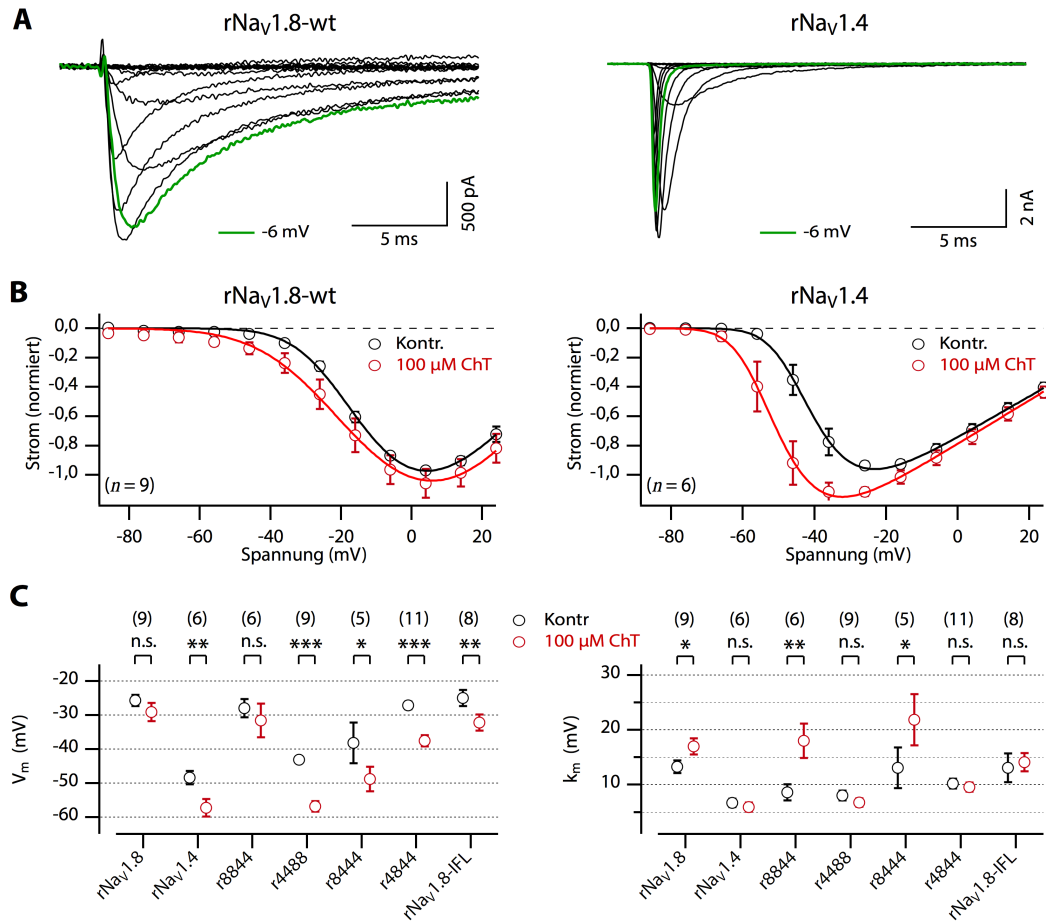


Abbildung 3.25.: Strom-Spannungsbeziehungen der Chimären. **A)** Repräsentative Stromantworten von rNa_v1.8 und rNa_v1.4 auf Testspannungen von –86 mV bis 24 mV in 10-mV-Schritten, ausgehend von einem Haltepotenzial von –120 mV. **B)** Durchschnittliche, normierte Strom-Spannungsbeziehungen von rNa_v1.8 (links) und rNa_v1.4 (rechts) mit Anpassung nach Gleichung 2.1 vor (schwarz) und nach der Wirkung von 100 μM ChT (rot). **C)** Durchschnittliche Werte der halbmaximalen Aktivierungsspannung V_m (links) und der Spannungsabhängigkeit k_m (rechts) der Chimären ohne IFC-Inaktivierungsmotiv vor (schwarz) und nach der Wirkung von 100 μM ChT (rot).

ders als der Wildtyp durch 100 μM ChT auf $-33,6 \pm 2,7$ mV verschoben ($p = 0,0002$; Abb. 3.26). Der Kanal rNa_v1.4-IFC wurde halbmaximal bei -45 ± 5 mV aktiviert, nach der Wirkung von 100 μM ChT indessen bei $-55,7 \pm 1,5$ mV ($p = 2 \cdot 10^{-5}$).

Die Spannungsabhängigkeit reduzierte sich bei rNa_v1.8-IFC um $4,6 \pm 0,8$ mV und bei rNa_v1.4-IFC um $2,2 \pm 0,5$ mV, was vermutlich am Zugewinn von Maximalstrom liegt. Die Chimären r8844-IFC und r8444-IFC zeigten beide keine Änderung von V_m durch Chloramin-T und wurden in einem ähnlichen Spannungsbereich wie rNa_v1.8-

3.4. Chimäre Kanäle von $rNa_V1.8$ und $rNa_V1.4$ geben Aufschluss über Angriffsorte reaktiver Spezies

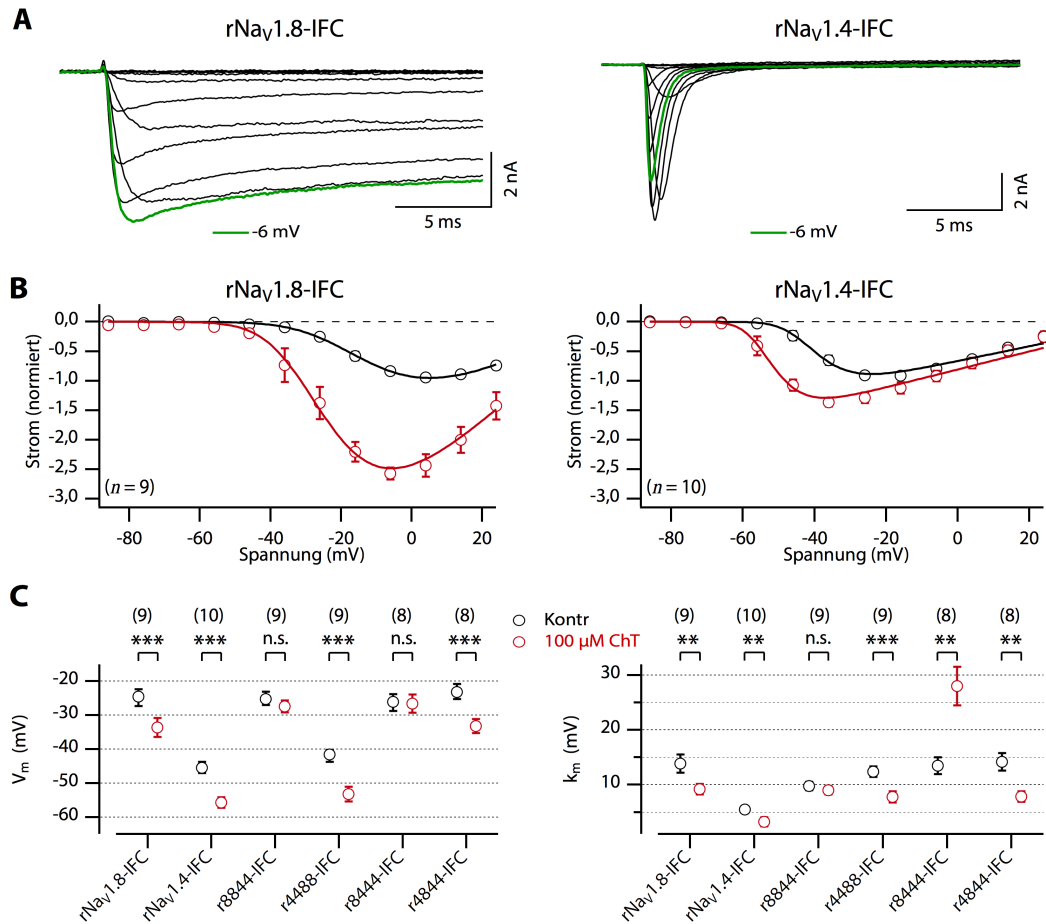


Abbildung 3.26.: Strom-Spannungsbeziehungen der IFC-Chimären. **A)** Repräsentative Stromantworten von $rNa_V1.8$ -IFC und $rNa_V1.4$ -IFC auf Testspannungen von -86 mV bis 24 mV in 10 mV-Schritten, ausgehend von einem Haltepotenzial von -120 mV. **B)** Durchschnittliche, normierte Strom-Spannungsbeziehungen von $rNa_V1.8$ -IFC (links) und $rNa_V1.4$ -IFC (rechts) mit Anpassung nach Gleichung 2.1 vor (schwarz) und nach der Wirkung von 100μ M ChT (rot). **C)** Durchschnittliche Werte der halbmaximalen Aktivierungsspannung V_m (links) und der Spannungsabhängigkeit k_m (rechts) der IFC-Chimären vor (schwarz) und nach der Wirkung von 100μ M ChT (rot).

IFC aktiviert. Bei den Chimären $r4488$ -IFC und 4844 -IFC verschob sich allerdings die halbmaximale Aktivierungsspannung um $-11,7 \pm 1,1$ ($p = 6 \cdot 10^{-5}$) beziehungsweise $-10,0 \pm 1,6$ mV ($p = 0,0003$). Auffällig war außerdem, dass die Chimäre $r8444$ -IFC die bei weitem stärkste Erhöhung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung aufwies, von $13,5 \pm 1,6$ mV auf $28,5 \pm 3,5$ mV ($p = 0,007$).

4. Diskussion

In der Vergangenheit konnte demonstriert werden, dass sowohl physiologische als auch pathophysiologische Prozesse mit dem Auftreten erhöhter Konzentrationen reaktiver Spezies einhergehen (Murphy *et al.*, 2011). So gibt es beispielsweise Indizien, dass reaktive Spezies von Entzündungsreaktionen die Signalweiterleitung afferenter Nerven negativ beeinflussen können (Nickel *et al.*, 2012). Es häufen sich jedoch auch Hinweise, dass reaktive Spezies neben ihrer Eigenschaft als Mediatoren pathophysiologischer Zustände zusätzlich ein großes Regulationspotenzial in physiologischen Umgebungen besitzen, welches allerdings noch Gegenstand aktueller Forschung ist (Ray *et al.*, 2012; Thannickal & Fanburg, 2000). Dementsprechend ist nur sehr wenig darüber bekannt, welchen Einfluss reaktive Spezies auf die elektrischen Eigenschaften von DRG-Neuronen haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der *patch clamp*-Methode untersucht, auf welche Art und Weise Aktionspotenziale in DRG-Neuronen durch reaktive Spezies beeinflusst werden und welche Rolle spannungsgesteuerte Natriumkanäle dabei spielen.

Reaktive Spezies wurden unter anderem durch Oxidanzien wie Chloramin-T erzeugt, welches eine hohe Ähnlichkeit zu physiologisch vorkommenden Chloraminen aufweist und präferentiell Methionine oxidiert (Shechter *et al.*, 1975). Chloramin-T ist in Konzentrationen von über 100 μM bereits bekannt als Modifikator spannungsgesteuerter Natriumkanäle, wobei vor allem das Inaktivierungsverhalten der Kanäle signifikant und irreversibel verlangsamt wird (Kassmann *et al.*, 2008; Wang, 1984).

Als alternative Methode zur Erzeugung reaktiver Spezies wurde die Bestrahlung mit blauem Licht verwendet, wodurch keine mechanischen Störungen an den Zellen verursacht wurden. Durch Lichtabsorption und anschließende Anregung von intrazellulären Chromophoren wie Flavinen kommt es zur Bildung von H_2O_2 , O_2^- und $^1\text{O}_2$ (Godley *et al.*, 2005; Lavi *et al.*, 2003).

4.1. Aktionspotenziale werden durch reaktive Spezies in DRG-Neuronen beeinflusst

Chloramin-T zeigte sich bereits in einer besonders niedrigen Konzentration von 10 μM wirksam. Die Frequenz repetitiver Aktionspotenziale wurde signifikant reduziert. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte auch die Bestrahlung mit Blaulicht niedriger Strahlungsleistung. Daraus folgt reduzierte Transmitterfreisetzung in den synaptischen Endknöpfchen und demzufolge eine Minderung des Informationsfluss.

Die einzelnen Aktionspotenziale innerhalb einer Aktionspotenzialserie fluktuieren beträchtlich. Das liegt unter anderem an der großen Abhängigkeit jedes Aktionspotenzials von vorangegangenen Aktionspotenzialen. So wurden unter anderem die einzelnen Aktionspotenziale innerhalb einer Serie nie zum gleichen Zeitpunkt ausgelöst. Zusätzlich schwankten Anstiegs- und Abfallzeit in Abhängigkeit des zwischen zwei Aktionspotenzialen auftretenden Membranpotenzials und der Dauer der Repolarisationsphase.

Um die Dynamik dieser Parameter einschränken zu können, wurden evozierte einzelne Aktionspotenziale in einem Abstand von 10 s, ausgehend von einem im Hintergrund festgelegten Membranpotenzial, wiederholt ausgelöst. Auf diese Weise konnten Änderungen einzelner Aktionspotenziale nachvollzogen werden. Sowohl Chloramin-T als auch blaues Licht führten zu einer Verbreiterung einzelner Aktionspotenziale und der Verlängerung der Aktionspotenzial-Fallphase. Höhere Konzentrationen beider Stressoren verstärkten diese Effekte noch einmal deutlich.

Auch das physiologische Oxidans Wasserstoffperoxid verbreiterte stimulierte Aktionspotenziale, allerdings in geringerem Umfang als Chloramin-T. Möglicherweise war die oxidative Wirkung von H_2O_2 und dessen Derivat tBHP wegen der äußeren Applikation vermindert, da die untersuchten Behandlungszeiten unter Umständen nicht ausreichten, um eine effektive Membranpassage beider Substanzen zu ermöglichen. Ferner liegt H_2O_2 nicht wie Chloramin-T in einem Gleichgewicht vor, bei dem besonders reaktive Zwischenprodukte existieren. H_2O_2 erreicht sein maximales oxidatives Potenzial nur durch den durch Übergangsmetalle katalysierten Zerfall in reaktivere Spezies wie OH^\bullet .

Die Ergebnisse der Wirkung reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale von $MSRA^{-/-}$ -Neuronen lassen sich nicht eindeutig interpretieren. Die untersuchten Aktionspotenziale wichen offenbar allein durch den *knock out* des Enzyms MSRA von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen ab. Vor allem die Abfallzeit und das Integral waren im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen erhöht. Es ist somit davon auszugehen, dass bereits vermehrt oxidative Modifikationen im gesamten Neuron und damit auch am Kanal $Na_v1.8$ stattgefunden hatten. Dadurch war die Wahrscheinlichkeit, zusätzliche Oxidationen zu induzieren, reduziert. Darauf deuten die geringeren Auswirkungen von Chloramin-T auf Aktionspotenziale von $MSRA^{-/-}$ -Neuronen hin. Blaulicht wirkte hingegen sogar stärker auf Aktionspotenziale von $MSRA^{-/-}$ -Neuronen als auf Wildtyp-Neuronen. Unter Umständen wären noch ältere Mäuse notwendig gewesen, damit sich eine größere Anzahl oxidativer Modifikationen anhäufen könnte, um einen eindeutigen Unterschied beobachten zu können. Es ist weiterhin ungewiss, in welchem Umfang und an welchen Positionen überhaupt oxidative Modifikationen von Methioninresten an spannungsgesteuerten Natriumkanälen stattgefunden haben.

4.2. $Na_v1.8$ ist besonders empfindlich gegenüber oxidativen Änderungen

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind an Aktionspotenzialen aller elektrisch erregbaren Zellen beteiligt. Um die Ursache der beschriebenen besonderen Sensitivität von DRG-Neuronen gegenüber reaktiven Spezies zu untersuchen, wurden einzelne Aktionspotenziale in $Na_v1.8^{-/-}$ -Neuronen evoziert. In diesen Neuronen war der für den Aufstich von Aktionspotenzialen in DRG-Neuronen besonders wichtige TTX-resistente Natriumkanal $Na_v1.8$ funktionell inaktiviert (Renganathan *et al.*, 2001). Die Aktionspotenziale von $Na_v1.8^{-/-}$ -Neuronen weichen trotz des fehlenden $Na_v1.8$ -Kanals, mit Ausnahme der reduzierten Amplitude, nur geringfügig von Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen ab. Dies liegt vermutlich an kompensatorischen Effekten auf Expressions-ebene. Vorstellbar ist unter anderem die vermehrte Expression von TTX-s-Natriumkanälen wie $Na_v1.7$ (Akopian *et al.*, 1999).

In $Na_v1.8^{-/-}$ -Neuronen zeigte sich eine signifikant verminderte Änderung stimulierter Aktionspotenziale, sowohl bei Verwendung von Chloramin-T als auch Blaulicht. Dies deutete bereits auf eine zentrale Rolle des Kanals $Na_v1.8$ bei der Vermittlung der beobachteten Auswirkungen auf Aktionspotenziale hin. Diese Vermutung konnte durch die Untersuchung von $Na_v1.8$ -Strömen mit Hilfe der Spannungsklemme bestätigt werden.

Für weitergehende Untersuchungen ist im Zusammenhang mit den Ergebnissen von $MSRA^{-/-}$ -Mäusen eine $MSRA^{-/-}$ -Mauslinie mit zusätzlichem *knock out* von $Na_v1.8$ vorstellbar. So könnte verglichen werden, ob Aktionspotenziale dieser Mäuse ebenso gering von reaktiven Spezies betroffen wären wie Aktionspotenziale von $Na_v1.8^{-/-}$ -Neuronen. Dies könnte ein weiteres Indiz für die besondere Bedeutung von $Na_v1.8$ hinsichtlich möglicher Alterungsprozesse sein.

4.3. Reaktive Spezies beeinflussen Ströme spannungsgesteuerter Natriumkanäle auf vielfältige und komplexe Weise

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Natriumkanalströme durch die Wirkung reaktiver Spezies insgesamt erhöht werden (Wang *et al.*, 2011). Bekannt ist mittlerweile auch, dass persistierende, englisch *resurgent currents* genannte Stromkomponenten TTX-resistenter Kanäle wie $Na_v1.8$, durch Entzündungsbotsstoffe moduliert werden können (Tan *et al.*, 2014). Es wurde außerdem ein kausaler Zusammenhang hergestellt

zwischen posttranslationalen Änderungen an $\text{Na}_V1.8$ durch Methylglyoxal bei diabetischer Neuropathie und erhöhter Schmerzwahrnehmung (Bierhaus *et al.*, 2012).

Der funktionelle Unterschied der beiden hauptsächlich verwendeten Stressoren Chloramin-T und Licht auf Natriumionenströme lässt sich neben methodischen Unterschieden (mechanische Agitation versus Lichtbestrahlung) durch die Verschiedenheit der erzeugten reaktiven Spezies erklären. Während die oxidative Spezifität von Chloramin-T für Methionine nachgewiesen ist, vermag blaues Licht eine Vielzahl reaktiver Spezies zu produzieren (Lavi *et al.*, 2003). Die spezielle Reaktivität dieser Spezies mit für Natriumkanälen kritischen Aminosäuren ist unbekannt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen an $\text{Na}_V1.8$ in $\text{Na}_V1.9^{-/-}$ -Neuronen zeigten infolge der Wirkung von 10 μM Chloramin-T eine deutliche Reaktion in den ersten 150 s nach Beginn der Perfusion. Der Maximalstrom wurde vermindert und bei Verwendung der zehnfachen Konzentration von Chloramin-T wurde zusätzlich die Kanalinaktivierung verlangsamt. TTX-s-Ströme hingegen, gemessen in $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen, waren nach dieser Zeit nur wenig beeinträchtigt. Bei näherer Betrachtung zeigte sich jedoch, dass TTX-s-Ströme in den ersten 100 s vor allem bei positiveren Spannungen erhöht wurden. Erst nach 150 s wurde der Maximalstrom der TTX-s-Kanäle reduziert.

Blaulicht verlangsamte die Inaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ signifikant bereits bei niedriger Strahlungsleistung und umso stärker bei hoher Strahlungsleistung. Blaulicht hoher Strahlungsleistung hatte zusätzlich eine reduzierende Wirkung auf den Maximalstrom. Die Verlangsamung der Inaktivierung infolge der Wirkung blauen Lichts fiel bei TTX-s-Strömen geringer aus als bei $\text{Na}_V1.8$. Wiederum war bei positiveren Spannungen ein kurzzeitiger Anstieg des Maximalstroms der TTX-s-Ströme feststellbar.

Speziell um die physiologische Relevanz oxidativer Veränderungen an Natriumkanälen beurteilen zu können, ist es sinnvoll, die Konzentrationen reaktiver Spezies sowohl *in vivo* als auch unter experimentellen Bedingungen zu messen. Dies ist jedoch aufgrund der immanenten Fehleranfälligkeit fluoreszenzbasierter Methoden hinsichtlich Genauigkeit und Spezifität nicht zuverlässig möglich (Kalyanaraman *et al.*, 2012; Zielonka & Kalyanaraman, 2010). Die spezifischere Elektronenspinresonanz-Spektroskopie ist wegen des Bedarfs sogenannter *spin traps* für *in vivo*-Experimente ungeeignet (Dikalov *et al.*, 2007).

Aus diesem Grund wurden Antioxidanzien verwendet. Mit Hilfe von Antioxidanzien konnte ein Redox-basierter Wirkmechanismus indirekt nachgewiesen werden. In Gegenwart von DTT blieb die Inaktivierung von $\text{Na}_V1.8$ auch bei Perfusion mit 100 μM Chloramin-T unverändert. Dies ist die Ursache für die dramatische Reduktion des Maximalstroms von $\text{Na}_V1.8$. Ohne den reduktiven Schutz intrazellulärer, für die Inaktivierung essentieller Aminosäuren wie dem Methionin des IFM-Motivs kommt es zu ei-

ner eintretenden Verlangsamung der Inaktivierung der Kanäle. Diese kompensiert den Verlust an Maximalstrom. In Gegenwart von DTT ist die Inaktivierung geschützt und verlangsamt sich nicht, wodurch sich der stark reduzierende Effekt von Chloramin-T auf den Maximalstrom zeigt. Der dadurch sichtbare Zusammenhang zwischen Kanalöffnung und Inaktivierung ist auch eine Erklärung für die in Abwesenheit von DTT sehr ähnliche Wirkung von 10 μM und 100 μM Chloramin-T auf den Maximalstrom. Bei einer ChT-Konzentration von 100 μM wird die Inaktivierung durch Chloramin-T so stark verlangsamt, dass der Rückgang des Maximalstroms teilweise kompensiert und überdeckt wird. Diese Ergebnisse lassen außerdem den Schluss zu, dass es für die Leitfähigkeit von $\text{Na}_V1.8$ essentielle Aminosäuren auf der Außenseite der Zellmembran geben muss, die entsprechend nicht durch intrazelluläres DTT geschützt werden können.

Die ohne DTT beobachtete anfängliche Erhöhung des Maximalstroms der TTX-s-Kanäle bei beiden Testspannungen war ebenfalls deutlich vermindert, wenn mit DTT in der Intrazellulärlösung gearbeitet wurde. Der Maximalstrom von TTX-s-Kanälen blieb bei geschützter Inaktivierung im Unterschied zu $\text{Na}_V1.8$ ungeändert. Dies deutet auf Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen $\text{Na}_V1.8$ - und TTX-s-Kanälen hin, die bei der Kanalöffnung relevant sind.

Paradoxerweise wurden die Auswirkungen blauen Lichts im Wesentlichen nur bei extrazellulärer Applikation abgemildert. Da die DTT-haltige Badlösung jedoch bereits bei Entnahme der Zellen aus dem Inkubator hinzugefügt wurde, ist es möglich, dass das DTT mit der Zeit in die Zelle diffundiert ist und somit zusätzlich auch intrazellulär wirkte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur intrazelluläre Chromophore für die Blaulicht-abhängige Freisetzung reaktiver Spezies verantwortlich sind. Denkbar sind radikalbildende Prozesse außerhalb der Zelle respektive in der Badlösung, die nur durch extrazelluläres DTT vermieden werden können. Hierbei ist zu beachten, dass das bestrahlte Volumen deutlich größer war als das Zellvolumen. Neben Zelldebris könnten so beispielsweise auch Bestandteile der extrazellulären Matrix in unmittelbarer Nähe zur Außenseite der Membran zerfallen und bei der Oxidation extrazellulärer Aminosäuren mitwirken (Wondrak *et al.*, 2003).

Wenn Cysteinreste erheblich zu den beobachteten Änderungen der Stromkurven beitragen, müsste der in der Kombination von extrazellulärem DTNB und intrazellulärem DTT verbleibende Effekt von ChT geringer sein. Cysteinreste auf der Außenseite der Membran werden durch DTNB so modifiziert, dass sie anschließend keine oxidative Änderung mehr erfahren können. In Experimenten mit DTT und DTNB war die Inaktivierung bereits vor Beginn der ChT-Applikation langsamer, änderte sich infolge der ChT-Behandlung aber aufgrund der schützenden Wirkung von DTT nicht weiter. Die anschließende Reduktion des Maximalstroms durch die Perfusion mit 100 μM Chloramin-

T war in Anwesenheit von DTNB unverändert stark. Hieraus lässt sich schließen, dass Cysteinmodifikationen auf der Außenseite der Membran für die Vermittlung der beobachteten Wirkung von Chloramin-T nicht maßgeblich sind. Das rückt Methioninreste als primäre Angriffsorte in den Vordergrund.

4.4. Der Zusammenhang zwischen der Änderung von Natriumkanalströmen und der Änderung von Aktionspotenzialen

Eine wie bei der Verwendung von Chloramin-T beobachtete Reduktion des Maximalstroms hätte aufgrund der Bedeutung spannungsgesteuerter Natriumkanäle für Aktionspotenziale auch eine mindernde Wirkung auf elektrische Signale. Ein Verlust von Inaktivierung, wie bei Verwendung von 100 μM ChT zu beobachten, hätte durch die Erhöhung der Stromdichte eine stimulierende Wirkung, die jedoch durch das komplizierte Zusammenspiel vieler verschiedener Ionenkanäle während des Feuerns von Aktionspotenzialserien nicht zwingend in ein verstärktes Signal übersetzt werden muss.

Der beobachtete Unterschied zwischen $\text{Na}_v1.8$ und TTX-s in der Antwort auf Chloramin-T stimmt mit dem erläuterten Unterschied zwischen Wildtyp- und $\text{Na}_v1.8^{-/-}$ -Neuronen hinsichtlich der Aktionspotenziale überein. Die Stromverminderung von $\text{Na}_v1.8$ erklärt auch die verminderte Aktionspotenzialfrequenz, da eine gleichbleibende Natriumstromdichte Grundvoraussetzung für das repetitive Feuern von Aktionspotenzialen ist (Madeja, 2000). Zusammen mit der bei 10 μM ChT zwar geringen, aber bei der 10-fach höheren Konzentration deutlichen Verlangsamung der Inaktivierung, ist dies auch eine Erklärung für die verbreiternde Wirkung auf einzelne Aktionspotenziale. TTX-s-Kanäle könnten im Verlauf der Aufstrichphase Verluste von $\text{Na}_v1.8$ -Nettostrom in den ersten Millisekunden noch ausreichend kompensieren, da TTX-s-Kanäle unmittelbar nach Beginn der Applikation von Chloramin-T einen Anstieg des Maximalstroms zeigten. Auch verschiebt sich die Aktivierung der TTX-s-Kanäle in einen negativeren Spannungsbereich, das heißt, der maximale durch diese Kanäle fließende Strom wird früher erreicht, was einem Funktionszugewinn gleichkommt. Neben der erwähnten kompensatorischen Bedeutung für die Aufstrichphase von Wildtyp-Neuronen könnte diese Kompensation auch der Grund für die geringen Änderungen von Aktionspotenzialen von $\text{Na}_v1.8^{-/-}$ -Neuronen sein.

Die langsamere Inaktivierung von $\text{Na}_v1.8$ sollte im Folgenden dafür sorgen, dass in der Fallphase des Aktionspotenzials für längere Zeit Natriumstrom fließt, was der Hyperpolarisation der Zellmembran entgegenwirkt und die Fallphase verlängert. Die Inak-

tivierung von TTX-r-Natriumkanälen wurde bereits als entscheidender Einflussfaktor auf die Fallphase von Aktionspotenzialen in DRG-Neuronen identifiziert (Blair & Bean, 2002).

Die verbreiternde Wirkung blauen Lichts auf stimulierte Aktionspotenziale ist wahrscheinlich hauptsächlich mit der Verlangsamung der Inaktivierung zu erklären. Weil der Maximalstrom von blauem Licht nur in geringerem Maße betroffen war, fiel vermutlich auch die Frequenzverminderung bei Aktionspotenzialserien in der Folge geringer aus als bei Verwendung von Chloramin-T. Auch Blaulicht hoher Strahlungsleistung hatte in den ersten 100 s eine steigernde Wirkung auf den Maximalstrom bei positiveren Membranspannungen. Dies könnte wiederum die Reduktion des Maximalstroms bei negativen Spannungen abmildern und die geringe Änderung der Aktionspotenziale von $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ -Neuronen erklären.

Die ermittelten Strom-Spannungsbeziehungen wurden vor und 600 s nach der Behandlung mit 100 μM ChT oder Blaulicht hoher Strahlungsleistung aufgenommen. Es zeigte sich neben den angesprochenen Wirkungen auf die Aktivierungsparameter eine Inhibition des Natriumstroms, sowohl bei $\text{Na}_V1.8$ als auch bei TTX-s-Kanälen. Der Zeitraum zwischen den Strom-Spannungsbeziehungen vor und nach Wirkung der reaktiven Spezies war mit 600 s deutlich größer als der sonst untersuchte Zeitraum von 150 s. Daher kann es sein, dass durch die hohen Konzentrationen reaktiver Spezies eine oxidative Sättigung an den Kanalproteinen vorlag. Das schränkt Rückschlüsse auf schnelle, dynamische Änderungen der Aktivierungsparameter ein.

Mit TTX in der Badlösung hatten die Aktionspotenziale eine Hyperpolarisation in einem positiveren Spannungsbereich und waren von Beginn an breiter. Dies könnte darin begründet sein, dass $\text{Na}_V1.8$ unter diesen Bedingungen allein für das Erreichen der Spannungsschwelle verantwortlich, welche um etwa 15 mV in einen positiveren Spannungsbereich verschoben war. $\text{Na}_V1.8$ ist in Gegenwart von TTX auch der einzige Natriumkanal, der den Aufstrich des Aktionspotenzials produziert, da der theoretisch vorhandene Kanal $\text{Na}_V1.9$ lediglich das Ruhepotenzial und unterschwellige Depolarisationen beeinflusst (Catterall *et al.*, 2005a). Da der TTX-s-Strom zum Überschreiten der Spannungsschwelle fehlt, kommt es zur verzögerten Öffnung von $\text{Na}_V1.8$, wodurch einerseits die Anstiegszeit und andererseits die Abfallzeit erhöht wird. Die Aktionspotenzialamplitude veränderte sich jedoch nicht. Das bestätigte, dass der Kanal $\text{Na}_V1.8$ die tragende Rolle bei Aktionspotenzialen spielt und TTX-s-Kanäle vor allem für die Feinabstimmung des Aktionspotenzials verantwortlich sind. Außerdem zeigte die unveränderte Amplitude auch, dass $\text{Na}_V1.8$ infolge der Präparation der DRG-Neuronen und unter den experimentellen Bedingungen nicht signifikant herunterreguliert wurde. Durch TTX in der Badlösung konnten die Wirkungen reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale vermindert

werden. Dies erscheint widersprüchlich, da die Auswirkungen von reaktiven Spezies in $\text{Na}_v1.8^{-/-}$ -Neuronen, in denen der Aufstrich von Aktionspotenzialen nur durch TTX-sensitive Natriumkanäle angetrieben wird, gering waren. Bei der Verwendung von TTX und Wildtyp-Neuronen sind TTX-s-Natriumkanäle nicht mehr an Aktionspotenzialen beteiligt, was die Wirkung reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale über die Modifikation von $\text{Na}_v1.8$ vergrößern sollte. Wegen der beschriebenen Veränderungen des Aktionspotenzials allein durch TTX ist es wahrscheinlich, dass der Kanal $\text{Na}_v1.8$ nicht von Beginn des stimulierten Aktionspotenzials an aktiviert gewesen ist. In der Folge wäre $\text{Na}_v1.8$ zu einem späteren Zeitpunkt als in Aktionspotenzialen von Wildtyp-Neuronen inaktiviert. Die Abfallzeit der Aktionspotenziale ist möglicherweise so stark verlängert, dass die verlangsamte Inaktivierung durch reaktive Spezies keinen zusätzlichen Einfluss auf die Abfallzeit hat. Ursächlich dafür könnten die mit fortgeschrittener Aktionspotenzialdauer ansteigenden Kaliumionenströme sein, die dem Natriumionenfluss entgegenwirken und die Fallphase schließlich bestimmen. In Gegenwart von TTX ist entsprechend die Bedeutung der Inaktivierung von $\text{Na}_v1.8$ für die Fallphase des Aktionspotenzials gemindert.

Es könnte sein, dass der Einfluss TTX-sensitiver Natriumkanäle und deren oxidativer Modifikation auf Aktionspotenziale experimentell überbetont wurde, da die Hälfte der Kanäle bereits bei einer gemessenen Membranspannung von -95 mV inaktiviert ist. Dieser Wert ist annähernd gleich dem von Matsutomi *et al.*, 2006 ermitteltem Wert von -93 mV . Während der Stimulation einzelner Aktionspotenziale wurde ein negatives Haltepotenzial von -83 mV im Hintergrund der Stromklemme angelegt. Dadurch sollten mehr TTX-sensitive Kanäle in einem aktivierbaren Zustand gewesen sein, als unter physiologischen Bedingungen, den Daten aus Abbildung 3.12 B entsprechend allerdings dennoch weniger als 15 % der gesamten Kanalpopulation. Für Spannungsklemmen-Experimente mit TTX-s-Kanälen wurde ein Haltepotenzial von -106 mV angelegt um die zusätzliche Aktivierung von theoretisch vorhandenen $\text{Na}_v1.9$ -Strömen von $\text{Na}_v1.8^{-/-}$ -Neuronen zu verhindern. Es könnte relevant sein, dass hierdurch viel mehr TTX-s-Kanäle angesprochen wurden, als unter physiologischen Bedingungen zur Verfügung stehen würden. Nicht unwahrscheinlich ist, dass die für die Spannungsklemme verwendeten Lösungen einen erheblichen Einfluss auf die gemessenen Kenngrößen haben, so dass die halbmaximale Inaktivierung der TTX-s-Kanäle mit den Intrazellulärlösungen der Stromklemme oder mit vollständig physiologischen Lösungen in einem positiveren Spannungsbereich verschoben wären.

Denkbar sind auch Unterschiede beziehungsweise Änderungen der Rückkehr aus der schnellen Inaktivierung, was im Gegenzug zu einer erhöhten oder verminderten Verfüg-

barkeit spannungsgesteuerter Natriumkanäle führt und insbesondere während repetitiver Aktionspotenziale relevant sein könnte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen einzelner Aktionspotenziale mit Ascorbinsäure deuten darauf hin, dass der Stress durch reaktive Spezies durch Antioxidanzien abgemildert wird. Die gesteigerte Anstiegszeit bei Verwendung von 10 µM ChT erklärt sich aus den Ergebnissen der Untersuchung von Na_v1.8-Strömen in Gegenwart von DTT: Auch durch Ascorbinsäure ist die Inaktivierung in gewissem Maße geschützt, wodurch ChT zu einer stärkeren Reduktion des Maximalstroms und damit zu einer Verlängerung der Anstiegszeit führt. Nicht auszuschließen ist indessen eine vorgeschlagene, gewisse prooxidative Wirkung von Ascorbat (Gamper & Ooi, 2014; Stadtman, 1991) in der Gegenwart von Übergangsmetallen (Koeppen *et al.*, 2013). Darauf deuten auch die substantielle Erhöhung von Abfallzeit und Integral von Aktionspotenzialen allein durch die Gegenwart von intrazellulärer Ascorbinsäure sowie die erheblich positivere Hyperpolarisationsspannung hin.

Da durch die Dialyse der *patch*-Pipettenlösung das reduktive Milieu der Zelle stark beeinträchtigt ist, bleibt ungewiss, inwieweit die beobachtete Wirkung reaktiver Spezies in Gegenwart von Ascorbinsäure möglicherweise der physiologischen Situation sogar ähnlicher ist.

4.5. Hinweise auf molekulare Ursachen der Änderung von Na_v1.8-Strömen

Durch Experimente mit Kanalchimären konnte gezeigt werden, dass die Domäne I des Kanals Na_v1.8 hauptsächlich für die Reduktion des Maximalstroms verantwortlich ist. Jedoch unterschied sich die heterolog exprimierte Variante von *Rattus norvegicus* insofern von der Variante von *Mus musculus*, dass die Maximalstromreduktion sich während der ChT-Applikation bereits wieder umkehrte. Dafür ist die Domäne II verantwortlich, da Chimären, bei denen ausschließlich die Domäne II von Na_v1.8 stammte, infolge der Behandlung mit reaktiven Spezies eine Vergrößerung des Maximalstroms zeigten. Diese trat in dieser Form bei keiner der anderen Chimären auf. Anhand von Strom-Spannungskurven zeigte sich, dass die Domänen I und II den überwiegenden Teil der charakteristischen Aktivierungseigenschaften auf den Kanal übertragen. So genügt die Domäne II von Na_v1.8 aus, den charakteristischen Spannungsbereich der Öffnung und deren Spannungsabhängigkeit zu übertragen. Der Domäne I scheint eine besondere Rolle im Festsetzen der Spannungsabhängigkeit zuzukommen, da Chimären, die einzig diese Domäne von Na_v1.8 besitzen, unter Einwirkung reaktiver Spezies die größte Erhö-

hung der Spannungsabhängigkeit zeigen. Die Domänen I und II von $\text{rNa}_V1.4$ scheinen dagegen für die oxidationsabhängige Verschiebung der halbmaximalen Aktivierung relevant zu sein.

$\text{Na}_V1.8$ -Kanäle aus *Rattus norvegicus* reagierten anders als $\text{Na}_V1.8$ -Ströme in DRG-Neuronen auf das Reduktionsmittel DTT. Selbst mit 2 mM intrazellulärem DTT war keine Änderung der Reaktion auf 100 μM ChT feststellbar. Die wahrscheinlichste Erklärung für dieses Phänomen ist die unterschiedliche Morphologie und experimentelle Vorbereitung der DRG-Neuronen als primäre Zellen im Vergleich zu kultivierten ND7/23-Zellen. DRG-Neuronen verloren durch die Enzymbehandlung ihr Axon und erst ab etwa Ende des zweiten Tages nach der Präparation konnte die Ausprägung neuer Dendriten beobachtet werden. So wurde in den vorliegenden Experimenten praktisch nur der Zellkörper der DRG-Neuronen vermessen, was sich insbesondere auch an der niedrigen durchschnittlichen Kapazität aller untersuchter DRG-Neuronen zeigte. Diese ist eine Messgröße für die gesamte Membranoberfläche und damit auch für alle potenziellen Fortsätze. Die Kapazität der untersuchten ND7/23-Zellen war deutlich höher (mittlere Membrankapazität = $27,85 \pm 0,77$ pF, $n = 221$ gegenüber $12,75 \pm 0,03$ pF, $n = 287$ in DRG-Neuronen). Da aber auch für diese Experimente nur Zellen ausgewählt wurden, die denen der DRG-Neuronen visuell entsprachen, war die höhere Kapazität ein Indiz für zahlreiche, unter dem Mikroskop nicht sichtbare Dendriten. Im Vergleich zu DRG-Neuronen konnten ND7/23-Zellen aufgrund des Fehlens des enzymatischen Verdaus durch die *Liberase*-Enzyme vermutlich sofort nach dem Ausplattieren mit der Bildung neuer Fortsätze beginnen. Diese Fortsätze konnten durch Dialyse mit der Intrazellulärlösung der *patch*-Pipette höchstwahrscheinlich nicht in einer angemessenen Zeit erreicht werden, weshalb DTT hier keine Wirkung entfalten konnte.

Mit Hilfe von $\text{rNa}_V1.8$ -IFL konnte gezeigt werden, dass der besondere Effekt der Maximalstromreduktion bei $\text{Na}_V1.8$ auch auftritt, wenn die Inaktivierung nicht oxidationsempfindlich ist und dementsprechend von denselben Konzentrationen reaktiver Spezies unangetastet blieb.

Es war nicht möglich, mit Hilfe der IFC-Chimären und dem Cystein-spezifischen Modifikators DTNB vor Beginn der Perfusion von ChT die Inaktivierung quantitativ zu verlangsamen. Die Wahrscheinliche Ursache ist wahrscheinlich erneut die Morphologie der ND7/23-Zellen. Aus demselben Grund, aus dem DTT nicht in der Lage war, die Wildtyp-Kanäle zu schützen, kann DTNB offenbar die Inaktivierung der IFC-Kanäle nicht quantitativ verlangsamen, weil es vermutlich gar nicht zu allen möglichen Zielproteinen gelangt. Das extrazelluläre Chloramin-T kann einerseits extrazelluläre Aminosäuren oxidieren, die für DTNB ohnehin unzugänglich wären und andererseits besteht die Möglichkeit, dass die entstehenden reaktiven Spezies die Membran passieren und so

auch intrazellulär wirken können.

Die IFC-Chimären zeigten eine wesentlich deutlichere Verlangsamung der Inaktivierung als die Wildtyp-Pendants. Bei allen diesen Chimären wurde infolge der ChT-Applikation ein Zuwachs an Maximalstrom festgestellt, der bei $rNa_V1.4$ sehr gering und bei der Chimäre r4844-IFC am ausgeprägtesten war. Diese deutete auf Besonderheiten der Domäne II in $rNa_V1.8$ hin, die durch oxidative Modifikation die Inaktivierung so stark beeinflussen, dass der Maximalstrom sich innerhalb von 200 s verdreifacht. Auch die Chimäre r4844 zeigte als einzige Chimäre ohne IFC-Motiv eine signifikante Maximalstromzunahme bei gleichzeitiger Verlangsamung der Inaktivierung. Deshalb ist die Verlangsamung der Inaktivierung scheinbar durch Domäne II von $rNa_V1.8$ vermittelt. Möglicherweise führen oxidative Änderungen auf der extrazellulären Seite des Kanals und speziell der Domäne II zu einer Beeinflussung der Anordnung der einzelnen Transmembransegmente, die dann die Interaktion des Inaktivierungsmotivs mit der Kanalpore auf der Innenseite hindert oder zur Kanalöffnung beiträgt.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind Methionine und Cysteine als einfach zu oxidierende Aminosäuren die wahrscheinlichsten Angriffsorte für reaktive Spezies innerhalb des Kanals $rNa_V1.8$. Da die deutlichsten Unterschiede zu $rNa_V1.4$ als repräsentativen TTX-s-Kanal in Domäne I und II festgestellt worden, könnten die drei in $Na_V1.8$ nicht-konservierten Aminosäuren M293, M371 und C815 essentiell für die Vermittlung der besonderen Reaktivität von $Na_V1.8$ gegenüber reaktiven Spezies sein (Abb. 4.1).

Jedoch ist es aufgrund des komplizierten Zusammenspiels von Aktivierung und Inaktivierung und der differentiellen Modifikation infolge des Wirkens reaktiver Spezies unwahrscheinlich, dass ein einfacher Aminosäureaustausch einen „Schwarz-Weiß-Effekt“ erzielen wird. So zeigten Kassmann *et al.*, dass selbst multiple Aminosäureaustausche von Methionin gegen Leucin die Oxidationsempfindlichkeit spannungsgesteuerter Natriumkanäle nicht vollständig beseitigen konnten (Kassmann *et al.*, 2008). Wahrscheinlich ist, dass verschiedene konservierte und nicht-konservierte Cystein- und Methioninreste gemeinsam $Na_V1.8$ zu seiner besonderen Sensitivität gegenüber reaktiven Spezies verhelfen.

4.6. Physiologische Relevanz der beobachteten Wirkung reaktiver Spezies

Die in dieser Arbeit vorgestellte Aktionspotenzialverbreiterung, verursacht vor allem durch eine Verlängerung der Abfallzeit, erinnert an die bereits 1988 von Scott *et al.* beobachtete Verlängerung der Abfallzeit einzelner Aktionspotenziale in gealterten Mäusen

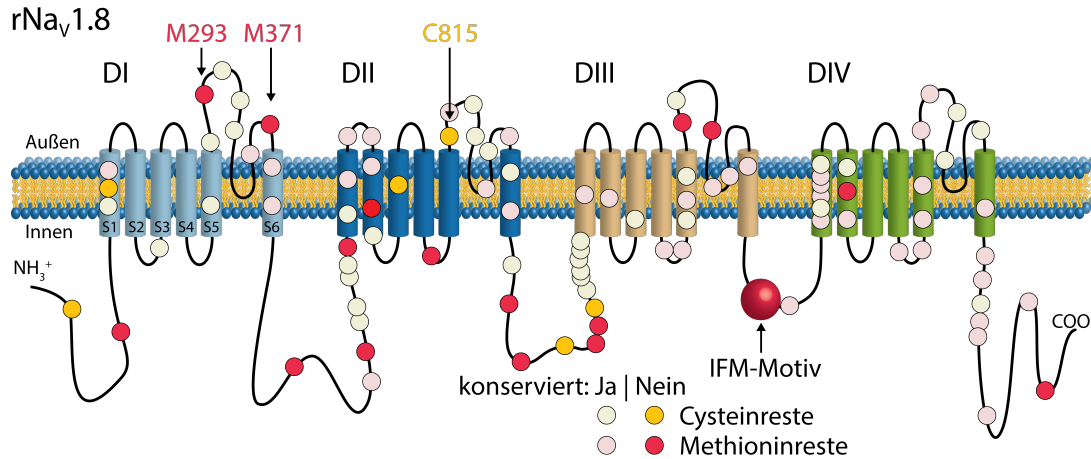


Abbildung 4.1.: Topologiemodell der Struktur spannungsgesteuerter Natriumkanäle mit hervorgehobenen Cystein- und Methioninresten. Es wurden die vollständigen Aminosäuresequenzen aller spannungsgesteuerten Natriumkanäle von *Rattus norvegicus* mit Hilfe des Programms *UGENE* und dem *MUSCLE*-Algorithmus aligniert (siehe auch Abschnitt 2.2). Hellrot und -gelb markierte Aminosäuren sind konserviert in allen spannungsgesteuerten Natriumkanälen von *Rattus norvegicus*. Dunkelrot und -gelb markierte Aminosäuren sind nicht-konserviert in rNa_v1.8.

(Scott *et al.*, 1988). Dies zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auch an Aktionspotenzialen von MSRA^{-/-}-Neuronen. Eine Verbreiterung des Aktionspotenzials würde im Allgemeinen eine längere Depolarisationsdauer an den synaptischen Endigungen bedeuten, was zu mehr Calciumeinstrom führen würde und sich in vermehrte vesikulärer Transmitterfreisetzung übersetzen sollte (Borst & Sakmann, 1999; Hochtner *et al.*, 1986). Die Situation *in vivo* ist allerdings weit komplexer, einerseits wegen der individuell schwankenden Ionenkanalkomposition eines jeden DRG-Neurons, andererseits weil die verletzten Zellen per Definition verletzt sind, wodurch sich Unterschiede zum physiologischen Zustand ergeben. Daraus folgt, dass die Auswirkungen der verwendeten Stressoren mit den zur Verfügung stehenden Mitteln unter Umständen unterschätzt wurden. Des Weiteren gibt es zusätzliche Modulationsmechanismen nicht nur bei der Signalweiterleitung an sich (Sasaki *et al.*, 2011), sondern auch bei der anschließenden Signalverarbeitung im Gehirn. Dadurch lässt sich nicht zweifelsfrei sagen, ob die beobachteten Ergebnisse insgesamt ein verstärktes oder vermindertes Signal bedeuten beziehungsweise ob und in welcher Form es zu (pathologischen) Wahrnehmungsänderungen kommt.

Sicher ist, dass bereits geringe Konzentrationen reaktiver Spezies erhebliche Auswirkungen auf die elektrischen Schlüsseleigenschaften von DRG-Neuronen in Form von Aktionspotenzialen haben. Die präsynaptische Änderung von Aktionspotenzialverläufen hat selbst in minimalem Umfang bereits gravierende Auswirkungen auf den Calci-

umeinstrom und die folgende Transmitterfreisetzung (Park & Dunlap, 1998). So führte beispielsweise in Purkinje-Neuronen eine Aktionspotenzialverlängerung von 8 % zu einem gleich großen Anstieg des relativen Calciumeinstroms und dementsprechend verstärkter Transmitterfreisetzung. Infolgedessen kam es zu einer Vergrößerung postsynaptischer Potenziale um insgesamt etwa 40 % (Sabatini & Regehr, 1997). Die relative Änderung des ursprünglichen Aktionspotenzials wurde demnach nicht-linear verstärkt.

Sowohl Chloramin-T als auch blaues Licht haben trotz der unterschiedlichen Antwort auf Stromebene einen vergleichbaren Effekt auf repetitive und einzelne, stimulierte Aktionspotenziale. Dies könnte auf einen komplexen antioxidativen Verteidigungsmechanismus hindeuten und passt zu der vorgeschlagenen Theorie, dass vor allem Methioninoxidationen eine zentrale Rolle bei dem Schutz vor oxidativen Schäden einnehmen (Levine *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1999). Methionin kann zwar leicht oxidiert, durch den Redox-Apparat der Zelle aber auch wieder reduziert werden und schützt so potenziell andere Proteinziele vor deren Oxidation. Dies würde auch erklären warum die besonders oxidationsempfindlichen Methionine an zentralen Positionen von Natriumkanälen vorkommen. Aufgrund der schnellen und signifikanten funktionellen Änderung bei allen verwendeten Stressoren erscheint auch eine Rolle von Na_V1.8 als multimodaler ROS-Sensor plausibel, der scheinbar sowohl auf intrazelluläre wie auch extrazelluläre reaktive Spezies in vielschichtiger Weise reagiert. Die Rolle eines Ionenkanals als Redox-Sensor konnte 2016 von Muralidharan *et al.* am Beispiel des Calciumkanals Ca_V1.2 im Herz gezeigt werden (Muralidharan *et al.*, 2016). Die funktionelle Änderung von Na_V1.8 könnte vielschichtige zelluläre Antworten veranlassen. Wegen der zahlreichen Hinweise über die Rolle von Na_V1.8 beispielsweise in neuropathischen Schmerzen ist allerdings auch eine rein pathologische Konsequenz der beobachteten Resultate vorstellbar (Waxman & Zamponi, 2014). Da Ionenkanäle immer weiter in den Fokus der Altersforschung rücken, könnten die vorliegenden Ergebnisse auch in diesem Kontext von Nutzen sein (Patel & Sesti, 2016).

4.7. Der potenzielle Einfluss anderer Ionenkanalfamilien

Einzelne, stimulierte Aktionspotenziale von Wildtyp-Neuronen werden durch reaktive Spezies stärker geändert als Aktionspotenziale von Na_V1.8^{-/-}-Neuronen. Deshalb erscheint es unwahrscheinlich, dass andere Kanäle als Na_V1.8 für die hier vorgestellten Änderungen von Aktionspotenzialen verantwortlich sind. Dennoch könnten möglicherweise A-Typ-Kaliumkanäle wie K_V1.4 durch reaktive Spezies in ihrer Inaktivierung be-

einträchtigt werden (Stephens *et al.*, 1996), was sich auf die Fallphase von Aktionspotenzialen auswirken könnte und damit auf die Fähigkeit der Neuronen, wiederholt Aktionspotenziale auszulösen. Eine Redox-Regulation wurde ebenso für in DRG-Neuronen auftretende M-Typ-Kaliumkanäle gezeigt (Gamper *et al.*, 2006). Da dies aber vor allem zur Änderung des Ruhepotenzials führen sollte, was in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden konnte, erscheinen auch diese Kanäle nicht verantwortlich. Wahrscheinlicher ist eine mögliche Beteiligung von BK-Kaliumkanälen (Li *et al.*, 2007), deren regulatorische Funktion innerhalb von Aktionspotenzialen noch nicht völlig verstanden ist. Da diese Kanäle spät in der Aktionspotenzial-Fallphase aktiv werden, würde eine Inhibition dieser Kanäle zu einer Verkürzung von Aktionspotenzialen führen. Gleichzeitig könnte dies aber auch schnellere Feuerraten ermöglichen. Unter anderem Wasserstoffperoxid inhibiert den Kanal Slo1BK, was allerdings experimentell mit 0,3 % H₂O₂ gezeigt wurde (DiChiara & Reinhart, 1997). Dies entspricht einer Konzentration von etwa 100 mM und liegt damit um einige Größenordnungen über dem, was in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. T-Typ-Calciumkanäle prägen die Schulter der Fallphase von Aktionspotenzialen und sind zumindest von Ascorbinsäure reguliert, was eindeutig auf eine Redox-basierte Modulation hindeutet, von der aber wenige Details bekannt sind (Nelson *et al.*, 2007). Unter physiologischen Bedingungen erfüllt Calcium als *second messenger* unzählige weitere regulatorische Funktionen. Eine Veränderung der Aktionspotenzialform hat auch einen veränderten Calciumspiegel innerhalb der Zelle zur Folge. Deshalb ist zumindest ein indirekter Einfluss von Calciumionen unter physiologischen Bedingungen zu erwarten, auch wenn die oxidative Modulation von Calciumkanälen selbst nicht zur Veränderung der Aktionspotenzialform beiträgt.

4.8. Schlussfolgerung

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass reaktive Spezies bereits in niedrigen Konzentrationen eine erhebliche Auswirkung auf elektrische Signale beziehungsweise Aktionspotenziale von Neuronen dorsaler Hinterwurzelganglien haben.

Dafür hauptverantwortlich ist die besondere Sensitivität des spannungsgesteuerten Natriumkanals Na_v1.8, der auf reaktive Spezies mit einer vielschichtigen Antwort in Form von reduziertem Maximalstrom und verlangsamter Inaktivierung reagiert, welche sich in Form von geänderten Aktionspotenzialen manifestiert (Schink *et al.*, 2015).

Die Wirkung reaktiver Spezies und die besondere oxidative Sensitivität von Na_v1.8 zeigte sich stark zeitabhängig. Vor allem die beobachteten Wirkungen reaktiver Spezies

bis zu einem Zeitpunkt von 150 s lassen auf ein hohes Potenzial zur dynamischen Regulation der elektrischen Aktivität sensorischer Nerven durch reaktive Spezies schließen.

Durch die Verwendung reduzierender Agenzien zeigte sich, dass die Effekte oxidativer Modifikationen stark abhängig sind von der Art der eingesetzten reaktiven Spezies. Weiterhin ist der Angriffsort entscheidend, da erhebliche Unterschiede zwischen extrazellulären und intrazellulären reaktiven Spezies festgestellt wurden.

Die beobachtete besondere oxidative Sensitivität von Na_v1.8 könnte für Neuronen von Nutzen sein. Diese besondere Eigenschaft trägt möglicherweise zu einem potenziellen Schutzmechanismus basierend auf oxidativen Modifikationen bei. Außerdem könnte Na_v1.8 als Sensor für Änderungen in der Homöostase reaktiver Spezies dienen. Da der Kanal Na_v1.8 aber auch in vielen neuropathologischen Krankheitsbildern als Schlüsselprotein identifiziert wurde, könnte die besondere Sensitivität des Kanals gegenüber reaktiven Spezies auch pathologische Konsequenzen haben.

Interessant ist für künftige Projekte unter anderem die Untersuchung der Signalweiterleitung am vollständigen sensorischen Nerv *in vivo*, wobei in diesem Fall die gezielte Applikation reaktiver Spezies das größte Problem sein dürfte.

Auf molekularer Ebene könnte der Mechanismus der Wirkung reaktiver Spezies auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle durch die gezielte Herstellung von Kanalkonstrukten mit Aminosäureaustauschen näher erforscht werden. Die vorliegenden Ergebnisse können als Grundlage zur Ermittlung der aussichtsreichsten Aminosäureaustausche dienen. Wenn es gelingen sollte, einzelne ausreichend große Abschnitte der Aminosäuresequenzen von Na_v1.8 rekombinant herzustellen, könnte mit Hilfe von Strukturaufklärungsmethoden wie Massenspektrometrie und NMR gezielt untersucht werden, welche Reste überhaupt zugänglich sind für oxidative Modifikationen und wie viele der zugänglichen Aminosäurereste nach einer bestimmten Zeit modifiziert sind.

Die hier vorgelegte Studie bietet dementsprechend eine Grundlage für die intensivere Erforschung des Zusammenhangs zwischen der regulatorischen Wirkung reaktiver Spezies und der Beeinflussung elektrischer Signale, nicht nur in Nervenzellen.

5. Zusammenfassung

5.1. Deutschsprachige Zusammenfassung

Sensorische Nerven beziehungsweise die DRG-Neuronen genannten Neuronen dorsaler Hinterwurzelganglien sind essentielle Schaltstellen am Übergang des peripheren in das zentrale Nervensystem und damit unter anderem bedeutend für die Schmerzwahrnehmung. Elementar für die elektrische Signalweiterleitung in DRG-Neuronen sind spannungsgesteuerte Natriumkanäle, die für die Aufstrichphase von Aktionspotenzialen verantwortlich sind.

Reaktive Spezies, die in vielen physiologischen Prozessen und in besonders hohen Mengen unter pathophysiologischen Bedingungen gebildet werden, sind assoziiert mit neuropathischen Krankheitsbildern. In Zusammenhang mit den komplexen antioxidativen Systemen auf Zellebene wurde jedoch in den letzten Jahren auch ein hohes regulatives Potenzial reaktiver Spezies gezeigt.

Aus diesem Grund sollte der Einfluss reaktiver Spezies auf die elektrische Aktivität in DRG-Neuronen der Maus untersucht werden.

Mit Hilfe der *patch clamp*-Methode konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Konzentrationen reaktiver Spezies, erzeugt durch das Oxidans Chloramin-T oder durch die Bestrahlung der Zellen mit blauem Licht, zu einer Verminderung der Aktionspotenzialfrequenz führten. Bei näheren Untersuchungen zeigte sich, dass einzeln ausgelöste Aktionspotenziale in Wildtyp-Neuronen durch dieselben Konzentrationen reaktiver Spezies verbreitert wurden.

Bei der Identifikation möglicher Ursachen wurde sich auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle konzentriert. Es konnte gezeigt werden, dass Aktionspotenziale von $\text{Na}_V 1.8^{-/-}$ -DRG-Neuronen eine deutlich geringere Verbreiterung stimulierter Aktionspotenziale durch reaktive Spezies zeigten. Dies deutete bereits auf eine wichtige Rolle von $\text{Na}_V 1.8$ in der Vermittlung der Sensitivität von DRG-Neuronen gegenüber reaktiven Spezies hin.

Die Untersuchung von $\text{Na}_V 1.8$ -Strömen zeigte, dass Chloramin-T vor allem den Maximalstrom des Kanals reduziert, während blaues Licht hauptsächlich die schnelle Inaktivierung verlangsamt. TTX-sensitive Natriumkanäle waren von denselben Konzentrationen reaktiver Spezies weniger betroffen. Diese Unterschiede zwischen $\text{Na}_V 1.8$ und TTX-s-Kanälen waren innerhalb der ersten 150 s nach Beginn der Behandlung mit reaktiven Spezies besonders betont.

Durch die Verwendung von Antioxidationsmitteln konnten die Auswirkungen reaktiver Spezies auf Aktionspotenziale gemindert und die Inaktivierung spannungsgesteuerter Natriumkanäle geschützt werden.

Verschiedene reaktive Spezies bewirken entsprechend unterschiedliche und teils voneinander abhängige Effekte auf Ionenkanäle, die jedoch offenbar von Aktionspotenzialen integriert werden und ähnliche Konsequenzen haben.

Zur Untersuchung molekularer Angriffsorte reaktiver Spezies wurden Natriumkanalchimären verwendet, die aus rNa_v1.8 und dem weniger oxidationsempfindlichen Kanal rNa_v1.4 zusammengesetzt waren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass für die Stromreduktion infolge der Perfusion mit Chloramin-T vor allem die Domäne I des Kanals Na_v1.8 verantwortlich ist. Auch in einer Variante des Kanals Na_v1.8, bei dem die Inaktivierung wenig oxidationsempfindlich ist („IFL“) konnte diese Maximalstromverminderung nachgewiesen werden.

Wurden die gleichen Chimären mit dem besonders oxidationsempfindlichen Inaktivierungsmotiv „IFC“ untersucht, konnte keine Stromreduktion infolge der Wirkung von Chloramin-T beobachtet werden. Im Gegenteil zeigte sich, dass die in diesen Chimären besonders starke Verlangsamung der Inaktivierung zu einem Zuwachs an Maximalstrom führte. Dies zeigt das komplexe Zusammenspiel aus Kanalöffnung- und inaktivierung und demonstriert die vielschichtigen Auswirkungen reaktiver Spezies auf spannungsgesteuerte Natriumkanäle.

Da DRG-Neuronen und der Kanal Na_v1.8 insbesondere mit veränderter Schmerzwahrnehmung assoziiert sind, ermöglichen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse das bessere Verständnis des komplizierten Einflusses von reaktiven Spezies auf sensorische Signale.

5.2. Summary (englischsprachige Zusammenfassung)

Sensory nerve fibres, i.e. the neurons of dorsal root ganglia (DRG neurons) are pivotal signal relay stations at the transition of the peripheral to the central nervous system and therefore among other things essential to pain perception. Voltage-gated sodium channels are fundamental to signal conduction in DRG neurons because they are responsible for the action potential upstroke.

Reactive Species that are produced in a variety of physiological processes and especially during pathophysiological conditions are associated with neuropathic diseases. However, in conjunction with the complex antioxidant defense mechanisms of the cell, it was shown that reactive species also possess great regulatory potential.

That is why the present thesis aimed at elucidating the influence of reactive species on the electrical activity of murine DRG neurons.

By using the patch clamp method, it could be shown that low concentrations of reactive species, induced by applying the oxidant chloramine-T or by illuminating neurons with blue light, caused a reduction of the action potential frequency. A closer look on single action potentials revealed that the same concentrations of reactive species caused the broadening of single action potentials in wild-type neurons.

To identify underlying mechanisms, the focus was laid on voltage-gated sodium channels. It could be shown that action potentials elicited from $\text{Na}_V 1.8^{-/-}$ -neurons that lacked the channel $\text{Na}_V 1.8$ were significantly less affected by reactive species. These results pointed to $\text{Na}_V 1.8$ as a major mediator of reactive species-sensitivity in DRG neurons.

By investigating $\text{Na}_V 1.8$ -currents, it could be shown that chloramine-T preferentially reduces the maximum current while blue light mainly slows down fast inactivation. TTX-sodium channels were less affected by either treatment. Differences between $\text{Na}_V 1.8$ and TTX-sodium channels were especially striking within the first 150 s of reactive species-treatment.

Antioxidants reduced the effects of reactive species on action potentials and protected the inactivation of voltage-gated sodium channels.

Different reactive species obviously lead to different and partially interconnected effects on the level of ion channels. These differential effects are apparently incorporated on the level of action potentials and have comparable consequences.

To identify molecular targets of reactive species, sodium channel chimeras were used that were composed of $\text{rNa}_V 1.8$ and the channel $\text{rNa}_V 1.4$, which is less susceptible to oxidative modifications. With this strategy it could further be demonstrated that the reactive species-induced peak current reduction is mostly mediated by domain I of $\text{Na}_V 1.8$.

A channel variant with less oxidation-susceptible inactivation („IFL“) exhibited the same type of maximum current reduction.

When channel chimeras with the particularly oxidation-sensitive inactivation motif „IFC“ were investigated, no reduction of maximum current was apparent. To the contrary, it could be shown that the strong impairment of inactivation led to an increase in maximum current. That demonstrates the complex connection of channel opening and inactivation and illustrates the multifarious modulation of these processes by reactive species.

As DRG neurons and specifically $\text{Na}_v1.8$ channels are associated with altered pain signalling, the results presented in this thesis facilitate understanding the complex consequences of reactive species on sensory signals.

6. Literaturverzeichnis

- Abrahamsen, B., J. Zhao, C. O. Asante, C. M. Cendan, S. Marsh, J. P. Martinez-Barbera, M. A. Nassar, A. H. Dickenson & J. N. Wood (2008). The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. *Science* **321**:702–205.
- Ahern, C. A. (2013). What activates inactivation? *The Journal of General Physiology* **142**:97–100.
- Ahern, C. A., J. Payandeh, F. Bosmans & B. Chanda (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *The Journal of General Physiology* **147**:1–24.
- Aidley, D. J. & P. R. Stanfield (1996). Ion Channels: Molecules in Action. 1. Ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Akopian, A. N., V. Souslova, S. England, K. Okuse, N. Ogata, J. Ure, A. Smith, B. J. Kerr, S. B. McMahon, S. Boyce, R. Hill, L. C. Stanfa, A. H. Dickenson & J. N. Wood (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience* **2**:541–548.
- Akopian, A. N., L. Sivilotti & J. N. Wood (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* **379**:257–262.
- Amaya, F., H. Wang, M. Costigan, A. J. Allchorne, J. P. Hatcher, J. Egerton, T. Stean, V. Morisset, D. Grose, M. J. Gunthorpe, I. P. Chessell, S. Tate, P. J. Green & C. J. Woolf (2006). The voltage-gated sodium channel Na_v1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience* **26**:12852–12860.
- Amir, R., M. Michaelis & M. Devor (1999). Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience* **19**:8589–8596.
- Annunziato, L., A. Pannaccione, M. Cataldi, A. Secondo, P. Castaldo, G. Di Renzo & M. Taglialetela (2002). Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? *Neurobiology of Aging* **23**:819–834.
- Bear, M. F., B. W. Connors & M. A. Paradiso (2012). Neuroscience: Exploring the Brain. 3. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Berlett, B. S. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **272**:20313–20316.
- Bierhaus, A., T. Fleming, S. Stoyanov, A. Leffler, A. Babes, C. Neacsu, S. K. Sauer, M. Eberhardt, M. Schnölzer, F. Lasitschka, F. Lasischka, W. L. Neuhuber, T. I. Kichko, I. Konrade, R. Elvert, W. Mier, V. Pirags, I. K. Lukic, M. Morcos, T. Dehmer, N. Rabhani, P. J. Thornalley, D. Edelstein, C. Nau, J. Forbes, P. M. Humpert, M. Schwaninger, D. Ziegler, D. M. Stern, M. E. Cooper, U. Haberkorn, M. Brownlee, P. W. Reeh & P. P. Nawroth (2012). Methylglyoxal modification of Na_v1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature Medicine* **18**:926–933.
- Bird, E. V., C. R. Christmas, A. R. Loescher, K. G. Smith, P. P. Robinson, J. a. Black, S. G. Waxman & F. M. Boissonade (2013). Correlation of Na_v1.8 and Na_v1.9 sodium

- channel expression with neuropathic pain in human subjects with lingual nerve neuromas. *Molecular Pain* **9**:1–11.
- Blair, N. T. & B. P. Bean (2002). Roles of Tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ current, TTX-resistant Na^+ current, and Ca^{2+} current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *The Journal of Neuroscience* **22**:10277–10290.
- Borst, J. G. & B. Sakmann (1999). Effect of changes in action potential shape on calcium currents and transmitter release in a calyx-type synapse of the rat auditory brainstem. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **354**:347–355.
- Brackenbury, W. J. & L. L. Isom (2011). Na^+ channel β subunits: overachievers of the ion channel family. *Frontiers in Pharmacology* **2**:1–11.
- Brandes, R. P., N. Weissmann & K. Schröder (2014a). Nox family NADPH oxidases in mechano-transduction: mechanisms and consequences. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**:887–898.
- Brandes, R. P., N. Weissmann & K. Schröder (2014b). Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **73**:70–79.
- Brette, R. (2012). Computing with neural synchrony. *PLoS Computational Biology* **8**:1–18.
- Catterall, W. A., A. L. Goldin & S. G. Waxman (2005a). International union of pharmacology. XLVII. nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews* **57**:397–409.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, T. P. Snutch & J. Striessnig (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews* **57**:411–425.
- Cejudo-Roman, A., F. M. Pinto, N. Subirán, C. G. Ravina, M. Fernández-Sánchez, N. Pérez-Hernández, R. Pérez, A. Pacheco, J. Irazusta & L. Candenás (2013). The Voltage-Gated Sodium Channel $\text{Na}_v1.8$ Is Expressed in Human Sperm. *PLoS ONE* **8**. Hrsg. von A. Guerrero-Hernandez:1–13.
- Cha, A., P. C. Ruben, J. George AL, E. Fujimoto & F. Bezanilla (1999). Voltage Sensors in Domains III and IV, but not I and II, are Immobilized by Na^+ channel fast inactivation. *Neuron* **22**:73–87.
- Chahine, M., R. Ziane, K. Vijayaragavan & Y. Okamura (2005). Regulation of Na_v channels in sensory neurons. *Trends in Pharmacological Sciences* **26**:496–502.
- Chen-Izu, Y., R. M. Shaw, G. S. Pitt, V. Yarov-Yarovoy, J. T. Sack, H. Abriel, R. W. Aldrich, L. Belardinelli, M. B. Cannell, W. A. Catterall, W. J. Chazin, N. Chiamvimonvat, I. Deschenes, E. Grandi, T. J. Hund, L. T. Izu, L. S. Maier, V. a. Maltsev, C. Marionneau, P. J. Mohler, S. Rajamani, R. L. Rasmusson, E. Sobie, C. E. Clancy & D. M. Bers (2015). Na^+ channel function, regulation, structure, trafficking and sequestration. *The Journal of Physiology* **593**:1347–1360.
- Choi, J.-S., A. Hudmon, S. G. Waxman & S. D. Dib-Hajj (2006). Calmodulin regulates current density and frequency-dependent inhibition of sodium channel $\text{Na}_v1.8$ in DRG neurons. *Journal of Neurophysiology* **96**:97–108.

- Cleland, W. W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3**:480–482.
- Colbert, C. M. & D. Johnston (1996). Axonal action potential initiation and Na⁺ channel densities in the soma and axon initial segment of subicular pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience* **16**:6676–6686.
- Cole, K. S. (1949). Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane. *Archives des Sciences Physiologiques* **3**:253–258.
- Commoner, B., J. Townsend & G. E. Pake (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* **174**:689–691.
- Coste, B., J. Mathur, M. Schmidt, T. J. Earley, S. Ranade, M. J. Petrus, A. E. Dubin & A. Patapoutian (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* **330**:55–60.
- Cummins, T. R., J. A. Black, S. D. Dib-Hajj & S. G. Waxman (2000). Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and Na^v sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience* **20**:8754–8761.
- D'Autr aux, B. & M. B. Toledano (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**:813–824.
- De Lera Ruiz, M. & R. L. Kraus (2015). Voltage-gated sodium channels: structure, function, pharmacology and clinical indications. *Journal of Medicinal Chemistry* **58**:7093–7118.
- Dib-Hajj, S. D., K. Ishikawa, T. R. Cummins & S. G. Waxman (1997). Insertion of a SNS-specific tetrapeptide in S3-S4 linker of D4 accelerates recovery from inactivation of skeletal muscle voltage-gated Na channel $\mu 1$ in HEK293 cells. *FEBS Letters* **416**:11–14.
- DiChiara, T. J. & P. H. Reinhart (1997). Redox modulation of *hslo* Ca²⁺-activated K⁺ channels. *The Journal of Neuroscience* **17**:4942–4955.
- Dickinson, B. C. & C. J. Chang (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nature Chemical Biology* **7**:504–511.
- Dikalov, S., K. K. Griendling & D. G. Harrison (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* **49**:717–727.
- Eck, P., O. Kwon, S. Chen, O. Mian & M. Levine (2013). The human sodium-dependent ascorbic acid transporters SLC23A1 and SLC23A2 do not mediate ascorbic acid release in the proximal renal epithelial cell. *Physiological Reports* **1**:1–10.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**:1792–1797.
- Eichler, M., R. Lavi, A. Shainberg & R. Lubart (2005). Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers in Surgery and Medicine* **37**:314–319.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**:70–77.
- Faber, C. G., G. Lauria, I. S. J. Merkies, X. Cheng, C. Han, H.-S. Ahn, A.-K. Persson, J. G. J. Hoeijmakers, M. M. Gerrits, T. Pierro, R. Lombardi, D. Kapetis, S. D. Dib-Hajj &

- S. G. Waxman (2012). Gain-of-function $\text{Na}_v1.8$ mutations in painful neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*:2–7.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP - phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**:164–166.
- Fidanboylyu, M., L. A. Griffiths & S. J. L. Flatters (2011). Global inhibition of reactive oxygen species (ROS) inhibits paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. *PLoS ONE* **6**:1–11.
- Gamper, N. & L. Ooi (2014). Redox and nitric oxide-mediated regulation of sensory neuron ion channel function. *Antioxidants & Redox Signaling* **22**:486–504.
- Gamper, N., O. Zaika, Y. Li, P. Martin, C. C. Hernandez, M. R. Perez, A. Y. C. Wang, D. B. Jaffe & M. S. Shapiro (2006). Oxidative modification of M-type K^+ channels as a mechanism of cytoprotective neuronal silencing. *The EMBO Journal* **25**:4996–5004.
- Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio & P. G. Pelicci (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**:722–728.
- Godley, B. F., F. a. Shamsi, F.-Q. Liang, S. G. Jarrett, S. Davies & M. Boulton (2005). Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **280**:21061–21066.
- Gold, M. S., D. Weinreich, C.-S. Kim, R. Wang, J. Treanor, F. Porreca & J. Lai (2003). Redistribution of $\text{Na}_v1.8$ in uninjured axons enables neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience* **23**:158–166.
- Gottardi, W. (1992). Wäßrige Chloramin-T Lösungen als Desinfektionsmittel: Chemische Zusammensetzung, Reaktivität und Toxizität. *Archiv der Pharmazie* **325**:377–384.
- Guskova, R. A., I. I. Ivanov, V. K. Koltover, V. V. Akhobadze & A. B. Rubin (1984). Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide (O_2^-) radicals. *Biochimica et Biophysica Acta* **778**:579–585.
- Hahn, M., A. Liebau, H. Rüttinger & R. Thamm (1994). Electrochemical investigation of chloramine T. *Analytica Chimica Acta* **289**:35–42.
- Halliwell, B. & M. Whiteman (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* **142**:231–255.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann & F. J. Sigworth (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **391**:85–100.
- Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research* **275**:257–266.
- Harty, T. P. & S. G. Waxman (2007). Inactivation properties of sodium channel $\text{Na}_v1.8$ maintain action potential amplitude in small DRG neurons in the context of depolarization. *Molecular Pain* **3**:12.
- He, X., Y. Zang, X. Chen, R. Pang, J. Xu, X. Zhou, X. Wei, Y. Li, W. Xin, Z. Qin & X. Liu (2010). TNF- α contributes to up-regulation of $\text{Na}_v1.3$ and $\text{Na}_v1.8$ in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain* **151**:266–279.

- Hediger, M. (2002). New view at C. *Nature Medicine* **8**:445–446.
- Heinemann, S. H., H. Terlau, W. Stühmer, K. Imoto & S. Numa (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**:441–443.
- Hekimi, S., J. Lapointe & Y. Wen (2011). Taking a „good“ look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology* **21**:569–576.
- Higure, Y., Y. Katayama, K. Takeuchi, Y. Ohtubo & K. Yoshii (2003). Lucifer Yellow slows voltage-gated Na⁺ current inactivation in a light-dependent manner in mice. *The Journal of Physiology* **550**:159–167.
- Hille, B. (2001). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2. Ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates Inc.
- Hochner, B., M. Klein, S. Schacher & E. R. Kandel (1986). Action-potential duration and the modulation of transmitter release from the sensory neurons of *Aplysia* in pre-synaptic facilitation and behavioral sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:8410–8414.
- Hodgkin, A. L. & A. F. Huxley (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* **117**:500–544.
- Höhn, A., J. König & T. Grune (2013). Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *Journal of Proteomics*:1–28.
- Hong, S., T. J. Morrow, P. E. Paulson, L. L. Isom & J. W. Wiley (2004). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *Journal of Biological Chemistry* **279**:29341–29350.
- Hoshi, T. & S. H. Heinemann (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology* **531**:1–11.
- Hu, D., H. Barajas-Martínez, R. Pfeiffer, F. Dezi, J. Pfeiffer, T. Buch, M. J. Betzenhauser, L. Belardinelli, K. M. Kahlig, S. Rajamani, H. J. Deantonio, R. J. Myerburg, H. Ito, P. Deshmukh, M. Marieb, G. B. Nam, A. Bhatia, C. Hasdemir, M. Haïssaguerre, C. Veltmann, R. Schimpf, M. Borggrefe, S. Viskin & C. Antzelevitch (2014). Mutations in SCN10A are responsible for a large fraction of cases of brugada syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* **64**:66–79.
- Huang, J. M., J. Tanguy & J. Z. Yeh (1987). Removal of sodium inactivation and block of sodium channels by chloramine-t in crayfish and squid giant axons. *Biophysical Journal* **52**:155–163.
- Ibi, M., K. Matsuno, D. Shiba, M. Katsuyama, K. Iwata, T. Takehi, T. Nakagawa, K. Sango, Y. Shirai, T. Yokoyama, S. Kaneko, N. Saito & C. Yabe-Nishimura (2008). Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *The Journal of Neuroscience* **28**:9486–9494.
- Jarvis, M. F., P. Honore, C.-C. Shieh, M. Chapman, S. Joshi, X.-F. Zhang, M. Kort, W. Carroll, B. Marron, R. Atkinson, J. Thomas, D. Liu, M. Krambis, Y. Liu, S. McGaraughty, K. Chu, R. Roeloffs, C. Zhong, J. P. Mikusa, G. Hernandez, D. Gauvin, C. Wade, C. Zhu, M. Pai, M. Scanio, L. Shi, I. Drizin, R. Gregg, M. Matulenko, A. Hakeem, M.

- Gross, M. Johnson, K. Marsh, P. K. Wagoner, J. P. Sullivan, C. R. Faltynek & D. S. Krafte (2007). A-803467, a potent and selective Na_v1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:8520–8525.
- Jones, D. T., W. R. Taylor & J. R. Thornton (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computational Applied Bioscience* **8**:275–82.
- Kahle, W. & M. Frotscher (2012). Color Atlas of Human Anatomy: Nervous System and Sensory Organs. 6. Ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Kallenborn-Gerhardt, W., K. Schroder, D. Del Turco, R. Lu, K. Kynast, J. Kosowski, E. Niederberger, a. M. Shah, R. P. Brandes, G. Geisslinger & A. Schmidtko (2012). NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. *The Journal of Neuroscience* **32**:10136–10145.
- Kalyanaraman, B., V. Darley-USmar, K. J. a. Davies, P. a. Dennery, H. J. Forman, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts & H. Ischiropoulos (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine* **52**:1–6.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum & A. J. Hudspeth (2012). Principles of Neural Science. 5. Ed. New York: McGraw-Hill.
- Kassmann, M., A. Hansel, E. Leipold, J. Birkenbeil, S.-Q. Lu, T. Hoshi & S. H. Heinemann (2008). Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **456**:1085–1095.
- Keck, R. G. (1996). The use of t-butyl hydroperoxide as a probe for methionine oxidation in proteins. *Analytical Biochemistry* **236**:56–62.
- Kim, D., B. You, E.-K. Jo, S.-K. Han, M. I. Simon & S. J. Lee (2010). NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:14851–14856.
- Kim, H. K., S. K. Park, J.-L. Zhou, G. Taglialatela, K. Chung, R. E. Coggeshall & J. M. Chung (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* **111**:116–124.
- Koeppen, A. H., E. C. Kuntzsch, S. T. Bjork, R. L. Ramirez, J. E. Mazurkiewicz & P. J. Feustel (2013). Friedreich ataxia: metal dysmetabolism in dorsal root ganglia. *Acta Neuropathologica Communications* **1**:1–10.
- Kole, M. H. P., S. U. Ilschner, B. M. Kampa, S. R. Williams, P. C. Ruben & G. J. Stuart (2008). Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nature Neuroscience* **11**:178–186.
- Lavi, R., A. Shainberg, H. Friedmann, V. Shneyvays, O. Rickover, M. Eichler, D. Kaplan & R. Lubart (2003). Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:40917–40922.
- Le, D. T., X. Liang, D. E. Fomenko, A. S. Raza & C.-k. Chong (2008). Analysis of methionine/selenomethionine oxidation and methionine sulfoxide reductase function using

- methionine rich proteins and antibodies against their oxidized forms. *Biochemistry* **47**:6685–6694.
- Lee, K. & D. Spanswick (2006). Pain. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**:541–543.
- Leipold, E., R. Markgraf, A. Miloslavina, M. Kijas, J. Schirmeyer, D. Imhof & S. H. Heinemann (2011). Molecular determinants for the subtype specificity of μ -conotoxin SIIIA targeting neuronal voltage-gated sodium channels. *Neuropharmacology* **61**:105–111.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta* **1366**:53–67.
- Levine, R. L., L. Mosoni, B. S. Berlett & E. R. Stadtman (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:15036–15040.
- Levine, R. L., B. S. Berlett, J. Moskovitz, L. Mosoni & E. R. Stadtman (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development* **107**:323–332.
- Li, W., S.-B. Gao, C.-X. Lv, Y. Wu, Z.-H. Guo & J.-P. Ding (2007). Characterization of voltage- and Ca^{2+} -activated K^{+} channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Cellular Physiology* **212**:348–357.
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology & Medicine* **60**:1–4.
- Lukacs, P., V. S. Gawali, R. Cervenka, S. Ke, X. Koenig, L. Rubi, T. Zarrabi, K. Hilber, A. Stry-Weinzinger & H. Todt (2014). Exploring the structure of the voltage-gated Na^{+} channel by an engineered drug access pathway to the receptor site for local anesthetics. *The Journal of Biological Chemistry* **289**:21770–21781.
- Lüscher, C., J. Streit, P. Lipp & H. R. Lüscher (1994a). Action potential propagation through embryonic dorsal root ganglion cells in culture. II. Decrease of conduction reliability during repetitive stimulation. *Journal of Neurophysiology* **72**:634–643.
- Lüscher, C., J. Streit, R. Quadroni & H. R. Lüscher (1994b). Action potential propagation through embryonic dorsal root ganglion cells in culture. I. Influence of the cell morphology on propagation properties. *Journal of Neurophysiology* **72**:622–633.
- Madeja, M. (2000). Do neurons have a reserve of sodium channels for the generation of action potentials? A study on acutely isolated CA1 neurons from the guinea-pig hippocampus. *The European Journal of Neuroscience* **12**:1–7.
- Marani, E. E. & E. a. J. F. Lakke (2012). *Peripheral Nervous System Topics*. 3rd. ed. Elsevier:82–140.
- Marmont, G. (1949). Studies on the axon membrane; a new method. *Journal of Cellular Physiology* **34**:351–382.
- Mary, J., S. Vouquier, C. R. Picot, M. Perichon, I. Petropoulos & B. Friguet (2004). Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Experimental Gerontology* **39**:1117–1123.
- Massey, V. (2000). The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochemical Society Transactions* **28**:283–296.

- Matsutomi, T., C. Nakamoto, T. Zheng, J.-I. Kakimura & N. Ogata (2006). Multiple types of Na⁺ currents mediate action potential electrogenesis in small neurons of mouse dorsal root ganglia. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **453**:83–96.
- Miller, J. P. & A. I. Selverston (1979). Rapid killing of single neurons by irradiation of intracellularly injected dye. *Science* **206**:702–704.
- Mittal, M., M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy & A. B. Malik (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling* **20**:1126–1167.
- Moldovan, M., S. Alvarez, V. Pinchenko, D. Klein, F. C. Nielsen, J. N. Wood, R. Martini & C. Krarup (2011). Na_v1.8 channelopathy in mutant mice deficient for myelin protein zero is detrimental to motor axons. *Brain* **134**:585–601.
- Moskovitz, J., S. Bar-Noy, W. M. Williams, J. Requena, B. S. Berlett & E. R. Stadtman (2001). Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:12920–12925.
- Mulkey, R. M. & R. S. Zucker (1991). Action potentials must admit calcium to evoke transmitter release. *Nature* **350**:153–155.
- Muralidharan, P., H. Cserne Szappanos, E. Ingley & L. Hool (2016). Evidence for redox sensing by a human cardiac calcium channel. *Scientific Reports* **6**:1–14.
- Murphy, M. P., A. Holmgren, N.-G. Larsson, B. Halliwell, C. J. Chang, B. Kalyanaraman, S. G. Rhee, P. J. Thornalley, L. Partridge, D. Gems, T. Nyström, V. Belousov, P. T. Schumacker & C. C. Winterbourn (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metabolism* **13**:361–366.
- Naik, A. K., S. K. Tandan, S. P. Dudhgaonkar, S. H. Jadhav, M. Kataria, V. R. Prakash & D. Kumar (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain* **10**:573–579.
- Nelson, M. T., P. M. Joksovic, P. Su, H.-W. Kang, A. Van Deusen, J. P. Baumgart, L. S. David, T. P. Snutch, P. Q. Barrett, J.-H. Lee, C. F. Zorumski, E. Perez-Reyes & S. M. Todorovic (2007). Molecular mechanisms of subtype-specific inhibition of neuronal T-type calcium channels by ascorbate. *The Journal of Neuroscience* **27**:12577–12583.
- Nickel, F. T., F. Seifert, S. Lanz & C. Maihöfner (2012). Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology* **22**:81–91.
- O'Brien, B. J., J. H. Caldwell, G. R. Ehring, K. M. Bumsted O'Brien, S. Luo & S. R. Levinson (2008). Tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channels Na_v1.8 and Na_v1.9 are expressed in the retina. *Journal of Comparative Neurology* **508**:940–951.
- Ojha, N. K., E. Nematian-Ardestani, S. Neugebauer, B. Borowski, A. El-Hussein, T. Hoshi, E. Leipold & S. H. Heinemann (2014). Sodium channels as gateable non-photon sensors for membrane-delimited reactive species. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1838**:1412–1419.
- Pape, H.-C., A. Kurtz & S. Silbernagl (2014). Physiologie. 7. Ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

- Park, D. & K. Dunlap (1998). Dynamic regulation of calcium influx by G-proteins, action potential waveform, and neuronal firing frequency. *The Journal of Neuroscience* **18**:6757–6766.
- Patel, R. & F. Sesti (2016). Oxidation of ion channels in the aging nervous system. *Brain Research* **44758**:1–11.
- Patlak, J. (1991). Molecular kinetics of voltage-dependent Na⁺ channels. *Physiological Reviews* **71**:1047–1080.
- Paulsen, C. E. & K. S. Carroll (2013). Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical Reviews* **113**:4633–4679.
- Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng & W. a. Catterall (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* **475**:353–358.
- Pero, R. W., Y. Sheng, A. Olsson, C. Bryngelsson & M. Lund-Pero (1996). Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis* **17**:13–18.
- Persson, A.-K., I. Kim, P. Zhao, M. Estacion, J. a. Black & S. G. Waxman (2013). Sodium channels contribute to degeneration of dorsal root ganglion neurites induced by mitochondrial dysfunction in an in vitro model of axonal injury. *Journal of Neuroscience* **33**:19250–19261.
- Quiñonez, M., M. DiFranco & F. González (1999). Involvement of methionine residues in the fast inactivation mechanism of the sodium current from toad skeletal muscle fibers. *Journal of Membrane Biology* **169**:83–90.
- Rangappa, K. S., K. Manjunathaswamy, M. P. Raghavendra & N. M. Made Gowda (2002). Kinetics and mechanism of oxidation of neutral α -amino acids by sodium N-Chloro-*p*-toluenesulfonamide in acid medium. *International Journal of Chemical Kinetics* **34**:49–55.
- Ray, P. D., B. W. Huang & Y. Tsuji (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* **24**:981–990.
- Redpath, J. L. (1973). Pulse radiolysis of dithiothreitol. *Radiation Research* **54**:364–374.
- Renganathan, M., T. R. Cummins & S. G. Waxman (2001). Contribution of Na_v1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *Journal of Neurophysiology* **86**:629–640.
- Ruan, H., X. D. Tang, M.-L. Chen, M.-L. a. Joiner, G. Sun, N. Brot, H. Weissbach, S. H. Heinemann, L. Iverson, C.-F. Wu, T. Hoshi, M.-L. Chen, M. a. Joiner & S. H. Heinemann (2002). High-quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:2748–2753.
- Rush, A. M., T. R. Cummins & S. G. Waxman (2007). Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Physiology* **579**:1–14.
- Sabatini, B. L. & W. G. Regehr (1997). Control of neurotransmitter release by presynaptic waveform at the granule cell to purkinje cell synapse. *The Journal of Neuroscience* **17**:3425–3435.

- Safronov, B. V., M. Wolff & W. Vogel (1999). Axonal expression of sodium channels in rat spinal neurones during postnatal development. *The Journal of Physiology* **514**:729–734.
- Sasaki, T., N. Matsuki & Y. Ikegaya (2011). Action-potential modulation during axonal conduction. *Science* **331**:599–601.
- Scheuer, T. (2011). Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**:160–165.
- Schink, M., E. Leipold, J. Schirmeyer, R. Schönherr, T. Hoshi & S. H. Heinemann (2015). Reactive species modify Na_v1.8 channels and affect action potentials in murine dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **468**:99–110.
- Schirmeyer, J. (2007). Funktionelle Analyse des spannungsgesteuerten Natriumkanals Na_v1.8 nach heterologer Expression in HEK293- und Neuro-2A-Zellen. Diss. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Schirmeyer, J. (2014). Molekulare Funktion und Regulation des spannungsabhängigen Natriumkanals Na_v1.8. Diss. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Schlieff, T., R. Schönherr, K. Imoto & S. H. Heinemann (1996). Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *European Biophysics Journal* **25**:75–91.
- Scott, B., J. Leu & B. Cinader (1988). Effects of aging on neuronal electrical membrane properties. *Mechanisms of Ageing and Development* **44**:203–214.
- Seltzer, Z., R. Dubner & Y. Shir (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43**:205–218.
- Sesti, F., S. Liu & S.-Q. Cai (2010). Oxidation of potassium channels by ROS: a general mechanism of aging and neurodegeneration? *Trends in Cell Biology* **20**:45–51.
- Shechter, Y., Y. Burstein & A. Patchornik (1975). Selective Oxidation of Methionine Residues in Proteins. *Biochemistry* **14**:4497–4503.
- Shields, S. D., H. S. Ahn, Y. Yang, C. Han, R. P. Seal, J. N. Wood, S. G. Waxman & S. D. Dib-Hajj (2012). Na_v1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system. *Pain* **153**:2017–2030.
- Sigworth, F. J. & E. Neher (1980). Single Na⁺ channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* **287**:447–449.
- Stadtman, E. R. (1991). Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition* **54**:1125–1128.
- Stadtman, E. R., H. Van Remmen, A. Richardson, N. B. Wehr & R. L. Levine (2005). Methionine oxidation and aging. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1703**:135–140.
- Stanley, G. B. (2013). Reading and writing the neural code. *Nature Neuroscience* **16**:259–63.
- Stephens, G. J., D. G. Owen & B. Robertson (1996). Cysteine-modifying reagents alter the gating of the rat cloned potassium channel K_v1.4. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **431**:435–442.

- Stewart, W. W. (1978). Functional connections between cells as revealed by dye-coupling with a highly fluorescent naphthalimide tracer. *Cell* **14**:741–759.
- Tan, Z.-Y., A. D. Piekarz, B. T. Priest, K. L. Knopp, J. L. Krajewski, J. S. McDermott, E. S. Nisenbaum & T. R. Cummins (2014). Tetrodotoxin-resistant sodium channels in sensory neurons generate slow resurgent currents that are enhanced by inflammatory mediators. *The Journal of Neuroscience* **34**:7190–7197.
- Tawfik, D. S. (2009). Modification of Sulfhydryl Groups with DTNB. *The Protein Protocols Handbook*. 3. Ed. Humana Press.
- Thannickal, V. J. & B. L. Fanburg (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **279**:1005–1028.
- Trimmer, J., S. Cooperman, S. Tomiko, J. Zhou, S. Crean, M. Boyle, R. Kallen, Z. Sheng, R. Barchi & F. Sigworth (1989). Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel. *Neuron* **3**:33–49.
- Tsai, C. J., K. Tani, K. Irie, Y. Hiroaki, T. Shimomura, D. G. McMillan, G. M. Cook, G. F. X. Schertler, Y. Fujiyoshi & X. D. Li (2013). Two alternative conformations of a voltage-gated sodium channel. *Journal of Molecular Biology* **425**:4074–4088.
- Vandewauw, I., G. Owsianik & T. Voets (2013). Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neuroscience* **14**:1–7.
- Verkerk, A. O., C. A. Remme, C. a. Schumacher, B. P. Scicluna, R. Wolswinkel, B. de Jonge, C. R. Bezzina & M. W. Veldkamp (2012). Functional Na_v1.8 channels in intracardiac neurons: the link between SCN10A and cardiac electrophysiology. *Circulation Research* **111**:333–343.
- Vijayaragavan, K., M. E. O’Leary & M. Chahine (2001). Gating properties of Na_v1.7 and Na_v1.8 peripheral nerve sodium channels. *The Journal of Neuroscience* **21**:7909–7918.
- Villière, V. & E. M. McLachlan (1996). Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *Journal of Neurophysiology* **76**:1924–1941.
- Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux & M. Lazdunski (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**:173–177.
- Wang, G. K. (1984). Irreversible modification of sodium channel inactivation in toad myelinated nerve fibres by the oxidant chloramine-T. *Journal of Physiology* **346**:127–141.
- Wang, H.-J., Y.-L. Li, L.-B. Zhang, I. H. Zucker, L. Gao, M. C. Zimmerman & W. Wang (2011). Endogenous reactive oxygen species modulates voltage-gated sodium channels in dorsal root ganglia of rats. *Journal of Applied Physiology* **110**:1439–1447.
- Waxman, S. G. & G. W. Zamponi (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience* **17**:153–163.
- West, J. W., D. E. Patton, T. Scheuer, Y. Wang, A. L. Goldin & W. A. Catterall (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:10910–10914.

- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* **4**:278–286.
- Wondrak, G. T., M. J. Roberts, D. Cervantes-Laurean, M. K. Jacobson & E. L. Jacobson (2003). Proteins of the extracellular matrix are sensitizers of photo-oxidative stress in human skin cells. *Journal of Investigative Dermatology* **121**:578–586.
- Wood, J. N., S. J. Bevan, P. R. Coote, P. M. Dunn, A. Harmar, P. Hogan, D. S. Latchman, C. Morrison, G. Rougon & M. Theveniau (1990). Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences* **241**:187–194.
- Woolf, C. J. & R. J. Mannion (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet* **353**:1959–1964.
- Zhang, J. Z., V. Yarov-Yarovoy, T. Scheuer, I. Karbat, L. Cohen, D. Gordon, M. Gurevitz & W. a. Catterall (2011). Structure-function map of the receptor site for β -scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels. *Journal of Biological Chemistry* **286**:33641–33651.
- Zielonka, J. & B. Kalyanaraman (2010). Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. *Free Radical Biology & Medicine* **48**:983–1001.
- Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* **429**:23–37.

A. Primer-Sequenzen

Im Falle von $\text{Na}_V1.8^{-/-}$ - und $\text{Na}_V1.9^{-/-}$ -Mauslinien wurde jeweils ein Vorwärts-*primer* verwendet, der mit den ersten Nukleotiden des Kanalgens hybridisierte. Dieser Vorwärts-*primer* wurde entweder mit einem Rückwärts-*primer* kombiniert, der eine in *knockout*-Mäusen fehlende Sequenz des Kanalgens zum Ziel hatte oder mit einem Primer, der die für die Herstellung der *knockout*-Mäuse verwendete Neomycin-Kassette zum Ziel hatte. Dadurch entstanden je nach Genotyp, bei einer der beiden Primerpaare ein Amplifikationsprodukt beziehungsweise im Fall von heterozygoten Mäusen beide Amplifikationsprodukte. Diese waren zur besseren Unterscheidung außerdem unterschiedlich groß. Im Falle von $\text{MSRA}^{-/-}$ -Mäusen gab es zwei unterschiedliche *primer*-Paare, die dem Nachweis nach dem beschriebenen Prinzip dienten (siehe Tabelle A).

Mauslinie	Verwendete Primer
$\text{Na}_V1.8^{-/-}$	Vorwärts, <i>Scn10A</i> : 5'-GCCTTCACTGTTGTTTACACCT-3' Rückwärts, <i>Scn10A</i> : 5'-GAGTGATGCATATGATGTCAT-3' Rückwärts, <i>Neomycin</i> -Gen: 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'
$\text{Na}_V1.9^{-/-}$	Vorwärts: 5'-ATGTGGCACTGGGCTTGAAGTC-3' Rückwärts, <i>Scn11A</i> : 5'-AACAGTCTTACGCTGTTCCGATG-3' Rückwärts, <i>Neomycin</i> -Gen: 5'-CTCGTCGTGACCCATGGCGAT-3'
$\text{MSRA}^{-/-}$	Vorwärts, <i>MSRA</i> : 5'-CTACCATCATTTTGCCACAGAGTGC-3' Rückwärts, <i>MSRA</i> : 5'-TGAGCCCAGTCCAGTTTGCTAAGC-3' Vorwärts, <i>Neomycin</i> -Gen: 5'-TGAATGAACTCCAAGACGAGGC-3' Rückwärts, <i>Neomycin</i> -Gen: 5'-TAAAGCACGAGGAAGCGGTCAG-3'

Tabelle A.1.: Primer zur Genotypisierung gentechnisch veränderter Mauslinien. Die linke Spalte bezeichnet die jeweilige zu genotypisierende Mauslinie und die rechte Spalte gibt die verwendeten *primer* zu den betreffenden Genen an.

Danksagung

Zuvorderst möchte ich meinem Doktorvater Professor Stefan H. Heinemann danken, der dieses Projekt initiierte und mich persönlich begleitete. Dies half mir bei der täglichen Arbeit und bei der Entwicklung einer guten wissenschaftlichen Praxis.

Ich danke außerdem allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biophysik, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Hervorheben möchte ich Jana Schirmeyer, die mit vielen Experimenten den Weg hin zu meinem Projekt ebnete und von deren molekularbiologischer Arbeit ich profitierte; Enrico Leipold, der mich unter anderem zur intensiveren Beschäftigung mit der Teilautomatisierung von Datenanalysen ermunterte; Angela Roßner, die mir bei der Präparation von DRG-Neuronen half und Eva-Maria Franke, die mir mit molekularbiologischen Arbeiten half. Des Weiteren danke ich Professor Ingo Dahse für viele Hinweise zum Verfassen wissenschaftlicher Texte. Außerdem danke ich meinen ehemaligen Kommilitonen Florian Ullrich und Martin Baunach für den regen Austausch bezüglich des Schreibens wissenschaftlicher Arbeiten.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Großeltern, die mich fortwährend unterstützten und mir ihr Vertrauen schenkten.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Anna-Maria Telschaft, auf deren Rückhalt ich mich immer verlassen konnte und die mir beim Korrekturlesen meiner Arbeit half.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbst verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Literaturquellen unter Berücksichtigung guter wissenschaftlicher Praxis verwendet zu haben. Unterstützung erfuhr ich dabei von meinem Doktorvater Prof. Stefan H. Heinemann.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen wurde und Dritte erhielten weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich erkläre weiterhin, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist. Dementsprechend wurde die vorliegende Dissertation keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt oder als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung benutzt.

Jena, den 4. Oktober 2016

Martin Schink

Lebenslauf und Publikationsliste

Persönliche Angaben

Name, Nationalität: Martin Schink, deutsch

Familienstand: ledig

Geburtsdatum und -ort: 01.04.1989 in Magdeburg

Ausbildung

2001 – 2007	Gymnasium Ascanium Aschersleben Abiturnote: 1,4
2007 – 2012	Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Abschluss als Diplom-Biochemiker Diplomnote: 1,5
seit 08/2012	Promotion am Lehrstuhl für Biophysik von Prof. Stefan H. Heinemann, Friedrich-Schiller-Universität Jena

wissenschaftliche Arbeitserfahrung

03/2008 – 04/2011	studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Biophysik von Prof. Stefan H. Heinemann, Friedrich-Schiller-Universität Jena
03/2011 – 04/2011	Praktikum im Labor von Dr. Holger Erfle, Zentrum für quantitative Analyse molekularer und zellulärer Biosysteme (Bio-Quant), Heidelberg
09/2011 – 11/2011	Praktikum im Labor von Prof. Toshinori Hoshi, University of Pennsylvania, Philadelphia

Auszeichnungen

2011	DAAD-Auslandsstipendium zur Anfertigung von Abschlussarbeiten
03/2015	Posterpreis bei der 94. Versammlung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft

Publikationsliste

Schink, M; Leipold, E; Schirmeyer, J; Schönherr, R; Hoshi, T; Heinemann, S H (2015). Reactive species affect action potentials and modify Na_v1.8 channels in murine dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* **468**:99–110

Jena, den 4. Oktober 2016

Martin Schink